

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE  
SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE

DOTTORATO DI RICERCA IN CHIMICA E TECNOLOGIA DEL FARMACO  
XXI CICLO

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE  
CHIM/01

***Potenzialità dell'elettroforesi capillare in analisi  
farmaceutica: sviluppo di metodi per il controllo di qualità  
mediante disegno sperimentale***

Candidato:  
**Dr. Iacopo GIANNINI**

Docente supervisore:  
Prof. Sergio PINZAUTI

Coordinatore del corso:  
Prof. Fulvio GUALTIERI

2006-2008

*“Better to be a peak than the baseline noise”*  
*K.D. Altria*

# INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Riassunto.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1. Introduzione .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2. Parte sperimentale .....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>3. Disegno sperimentale .....</b>   | <b>5</b>  |
| 3.1. Matrici .....   | 10        |
| 3.2. Criteri di qualità .....  | 13        |
| 3.3. Analisi della varianza e analisi statistica dei coefficienti.....   | 14        |
| 3.4. Disegno di miscele .....  | 17        |
| <b>4. Elettroforesi capillare .....</b>  | <b>22</b> |
| 4.1. Principi generali .....   | 22        |
| 4.2. Applicazioni in analisi farmaceutica .....  | 27        |
| 4.3. Effetto di modificatori organici.....   | 29        |
| 4.3.1. Ottimizzazione multivariata e convalida di un metodo di elettroforesi capillare per la determinazione di resveratrolo in un prodotto nutraceutico .....                                     | 30        |
| 4.4. Aggiunta di ciclodestrine .....   | 35        |
| 4.4.1. Sviluppo di un metodo elettroforetico capillare per la determinazione di mizolastina e delle sue impurezze in forme farmaceutiche mediante la metodologia della superficie di risposta..... | 38        |
| 4.5. MEKC .....  | 46        |
| 4.5.1. Insidie e successi nell'applicazione del disegno sperimentale allo sviluppo di un metodo MMEKC per l'analisi di budesonide e delle sue impurezze .....                                      | 52        |
| 4.6. MEEKC .....   | 58        |
| 4.6.1. Disegno di miscele nell'ottimizzazione di un metodo CD-MEEKC per la determinazione di oxibutinina e delle sue impurezze .....   | 65        |
| <b>5. Conclusioni .....</b>  | <b>72</b> |
| <b>6. Bibliografia .....</b>   | <b>73</b> |
| <b>7. Appendice .....</b>  | <b>78</b> |

## RIASSUNTO

Nel corso di questo Dottorato di Ricerca sono stati sviluppati metodi di elettroforesi capillare applicabili al controllo di qualità in campo farmaceutico. Per l'ottimizzazione di questi metodi è stato seguito un approccio multivariato, applicando strategie di disegno sperimentale, che hanno permesso di individuare le migliori condizioni di analisi con la minor spesa in termini di tempo e denaro.

In particolare sono state studiate varie modalità operative dell'elettroforesi capillare che hanno permesso di risolvere quattro sfide analitiche diverse grazie alla grande versatilità di questa tecnica separativa.

Il primo studio è consistito nell'ottimizzazione di un metodo per la determinazione di resveratrolo in un prodotto nutraceutico che conteneva altri composti bioattivi. Tale metodo si è basato sull'aggiunta di un solvente organico al BGE, che in generale può causare una riduzione del flusso elettroosmotico, portando ad una migliore risoluzione tra gli analiti, anche se a fronte di maggiori tempi di analisi. L'acetonitrile in particolare ha il vantaggio di agire come un composto inerte in tamponi acquosi e di non variare significativamente la viscosità del sistema ed è stato selezionato come modificatore per il nostro sistema separativo. Lo sviluppo del metodo ha previsto l'applicazione della metodologia della superficie di risposta, utilizzando un disegno Central Composite. Le condizioni così ottimizzate hanno permesso la determinazione di resveratrolo in compresse effervescenti di Resvis XR<sup>®</sup>, rappresentando un metodo rapido ed efficace per la determinazione di questa sostanza di origine naturale in una forma farmaceutica.

Sono inoltre stati sviluppati tre metodi che hanno previsto rispettivamente la determinazione dei principi attivi mizolastina, budesonide ed oxibutinina nella forma farmaceutica in presenza delle loro impurezze di sintesi. Questo tipo di analisi rappresenta una sfida alla selettività della tecnica e costituisce un fertile terreno per lo studio delle diverse modalità operative possibili in CE, in quanto le impurezze solitamente presentano strutture molto simili a quelle dell'analita principale.

Per la contemporanea determinazione dell'antistaminico mizolastina e delle sue impurezze basiche è stata sfruttata l'inversione del flusso elettroosmotico, dovuta all'aggiunta di trietanolamina ad un tampone acido. Questo effetto, unito all'aggiunta di una ciclodestrina, ha permesso di modulare la selettività del sistema, portando alla separazione di tutti gli analiti.

Gli esperimenti necessari allo sviluppo del metodo sono stati pianificati mediante un disegno di Doehlert, e le condizioni ottimizzate sono state applicate all'analisi di un campione reale di compresse a rilascio modificato di Mizollen®.

Nello studio per la determinazione del corticosteroide budesonide e sue impurezze, tutti gli analiti erano specie neutre e quindi non dissociate in soluzione acquosa. È stato dunque necessario ricorrere ad una modalità operativa che permettesse di separare i composti in base alla loro diversa affinità per una fase pseudostazionaria. I migliori risultati sono stati ottenuti in modalità MMEKC, che prevedeva l'aggiunta al BGE di due tensioattivi con diverse caratteristiche strutturali, permettendo di controllare più finemente i meccanismi di ripartizione degli analiti e quindi la selettività del sistema. Durante la fase di ottimizzazione del metodo la strategia multivariata è stata sottoposta ad uno studio approfondito, evidenziando le sue potenzialità nella risoluzione di problemi anche complessi, ma allo stesso tempo sottolineando i possibili rischi dovuti ad una sua applicazione indiscriminata senza possedere una chiara visione dello spazio sperimentale da investigare.

Un nuovo sistema separativo è stato poi impiegato per l'analisi dell'antimuscarinico oxibutinina e delle sue impurezze. Anche in questo caso erano presenti analiti con caratteristiche neutre, quindi per la loro completa risoluzione si è dovuto ricorrere all'utilizzo di una fase pseudostazionaria, costituita da una microemulsione. La modalità operativa prescelta è stata la CD-MEEKC, nella quale alla microemulsione viene aggiunta un'opportuna ciclodestrina che, formando una seconda fase pseudostazionaria, agisce in competizione con questa. Visto il gran numero di variabili presenti in un sistema complesso come questo, l'approccio multivariato all'ottimizzazione del metodo è stato diviso in due parti. In una prima fase con un disegno di miscele si sono individuate le proporzioni ottimali dei componenti la microemulsione, poi con un disegno di Doehlert sono stati studiati i fattori indipendenti concentrazione di ciclodestrina e voltaggio. Il metodo è stato quindi applicato all'analisi di un campione reale di compresse contenenti oxibutinina.

Affinché i metodi sviluppati potessero risultare applicabili in analisi di routine nel controllo di qualità, sono stati tutti convalidati seguendo le linee guida dettate dall'ICH, che prevedevano a loro volta l'utilizzo di una strategia multivariata per la valutazione del test di robustezza.

## 1. INTRODUZIONE

L'analisi farmaceutica è uno strumento necessario per assicurare una somministrazione sicura ed efficace di farmaci. Lo sviluppo di tecniche analitiche appropriate è quindi parte integrante della nascita e della vita di un farmaco dal momento che metodi analitici convalidati sono di supporto per gli studi di farmacocinetica, di profilo metabolico, di stabilità per l'assicurazione di qualità del prodotto finale.

Metodologie convalidate per l'analisi qualitativa e quantitativa del principio attivo e delle sue impurezze non solo sono richieste dagli organi governativi per la commercializzazione del farmaco, ma all'interno delle industrie hanno un ruolo chiave nel controllo di qualità. Molto spesso questo tipo di analisi viene effettuato attraverso HPLC, ma negli ultimi anni l'elettroforesi capillare (*Capillary Electrophoresis*, CE) ha guadagnato popolarità come tecnica alternativa e complementare per le applicazioni farmaceutiche [20-23].

I maggiori vantaggi dell'uso della CE in analisi farmaceutica sono il basso consumo di solvente (millilitri rispetto a litri in HPLC), la velocità ed il basso costo di analisi, oltre al trattamento del campione, che spesso risulta semplificato perché molti componenti interferenti non presentano una propria mobilità elettroforetica in quanto neutri. In CE inoltre la possibilità di utilizzare un singolo set di condizioni operative per campioni di diverso tipo, unitamente ai bassi tempi di condizionamento del capillare, porta ad un notevole risparmio di tempo nella messa a punto del sistema [22].

In generale, nell'ottimizzazione dei metodi CE deve essere tenuto in considerazione un numero elevato di variabili (temperatura, voltaggio, concentrazione, composizione e pH del BGE, tipo e concentrazione di eventuali additivi e così via), che possono anche presentare interazioni tra di loro. In questa fase risulta quindi fondamentale utilizzare una strategia multivariata quale il disegno sperimentale [6,7] per individuare le migliori condizioni operative, approccio già efficacemente utilizzato in alcune applicazioni di CE in analisi farmaceutica [24-30]. In questo modo i dati necessari sono ottenuti con il minor costo possibile sia in termini di tempo che di denaro, evitando esperimenti inutili e ottenendo la massima e la migliore qualità di informazione con il minimo sforzo. Il metodo tradizionale univariato OVAT risulta infatti molto meno efficiente, razionale ed economico del disegno sperimentale [1].

In questo lavoro di tesi sono state analizzate varie modalità operative della CE che hanno permesso di risolvere i più diversi problemi analitici, proprio grazie alla versatilità di questa tecnica ed alla possibilità di regolare con facilità i suoi parametri in base alle diverse necessità separative. In particolare, dopo una breve descrizione delle tecniche di disegno sperimentale e di elettroforesi capillare utilizzate, vengono qui presentati quattro metodi applicabili all'analisi di routine in campo farmaceutico. Il primo studio presenta lo sviluppo di un metodo per la determinazione di resveratrolo in un composto nutraceutico in presenza di altre sostanze bioattive. I tre lavori successivi hanno tutti riguardato l'ottimizzazione di metodi per la simultanea determinazione di principi attivi nelle forme farmaceutiche e delle loro impurezze. Recentemente sono stati pubblicati alcuni lavori sull'applicazione di diverse modalità operative della CE nell'*impurity profiling* [24-30]. È infatti importante riconoscere che tutti i farmaci contengono impurezze che oltre a compromettere la purezza del principio attivo possono presentare una diversa attività farmacologica talvolta anche tossica. Sono stati quindi sviluppati, in base alle diverse caratteristiche degli analiti, un metodo CZE per la determinazione di mizolastina, un metodo MMEKC per quella di budesonide ed un metodo CD-MEEKC per l'analisi di oxybutinina in presenza delle loro impurezze.

Dopo la fase di ottimizzazione, tutti i metodi studiati sono stati convalidati. La convalida di una procedura analitica viene effettuata per assicurare che questa garantisca adeguate prestazioni e fornisca dati affidabili. Si deve cioè dimostrare che il metodo sia adatto allo scopo prefissato e che risponda a particolari specifiche dettate dai principali organi regolatori. In particolare in questo caso i requisiti dei metodi sviluppati sono stati testati seguendo le specifiche dettate dalle più recenti linee guida ICH [94].

## **2. PARTE SPERIMENTALE**

Le tecniche ed i metodi discussi nella presente tesi sono stati oggetto o sono in corso di pubblicazione, pertanto per la relativa parte sperimentale si rimanda agli estratti allegati nel cap.7 "Appendice".

### 3. DISEGNO SPERIMENTALE

Nell'ambito delle scienze sperimentali la selezione degli esperimenti da condurre riveste grande importanza; una strategia ideale dovrebbe:

- fornire i risultati più velocemente possibile;
- evitare esperimenti non necessari;
- assicurare che i risultati siano più precisi possibile;
- fornire modello e ottimizzazione dei fenomeni studiati [1].

Il metodo classico nello studio di un fenomeno è l'approccio OVAT (*One Variable at A Time*), in cui viene effettuata la variazione di una sola variabile alla volta, tenendo tutte le altre ad un livello fisso. Nonostante questo sia un approccio semplice, facile da controllare e interpretare, le sue limitazioni principali sono la perdita di informazioni sull'interazione tra variabili e l'alto numero di esperimenti necessari [4]. Come alternativa all'approccio OVAT si ha il *disegno sperimentale*, che utilizza un approccio multivariato in cui i valori di tutte le variabili sono modificati simultaneamente in ogni esperimento in modo programmato e razionale [1]. Esso include specificazione delle condizioni sperimentali, cioè specificazione dei fattori il cui effetto sul risultato dell'esperimento verrà studiato, specificazione dei livelli di questi fattori, selezione delle risposte da misurare, scelta di un modello statistico per correlare i dati ed infine selezione degli esperimenti da condurre.

I vantaggi che offre il disegno sperimentale sono [1]:

- minor numero di prove;
- elevato numero di fattori che possono essere studiati;
- individuazione delle interazioni tra fattori;
- costruzione di un modello dai risultati;
- individuazione delle condizioni ottimali per la procedura in studio.

È necessario definire precisamente i dati del problema per poter poi stabilire un insieme di prove da eseguire. Il ricercatore si interessa in primo luogo dei fattori, supposti o certi, che agiscono sul fenomeno in studio. Una *variabile* è definita come una caratteristica di un oggetto che può assumere qualsiasi valore all'interno di un insieme determinato di valori [4]. Nel disegno sperimentale le variabili devono essere fra loro indipendenti e sono anche dette *fattori*. Le caratteristiche dei fattori possono essere diverse: un fattore può essere qualitativo o quantitativo, continuo o discontinuo, controllabile o non controllabile [5]. Gli effetti di ogni



variabile possono essere determinati imponendo a queste delle variazioni che causano delle modifiche nel comportamento del fenomeno studiato. A questo fine è definito un dominio all'interno del quale ogni variabile può assumere diversi valori o *livelli*.

Il *dominio sperimentale* [5] è il dominio entro cui si muove lo sperimentatore. La scelta di tale dominio è estremamente importante; può accadere infatti che le prove iniziali non forniscano sufficienti informazioni, ma i risultati ottenuti possono essere sfruttati dallo sperimentatore per definire un nuovo dominio in cui c'è una buona probabilità di trovare la soluzione del problema, e sarà appunto quest'ultimo il dominio d'interesse.

Per rendere comparabili gli effetti delle variabili naturali, che non sono espresse dalle stesse unità di misura, queste vengono sottoposte a due trasformazioni [5].

La prima consiste nel *cambiamento in origine*, per cui la nuova origine è il centro del dominio sperimentale in modo che le variabili risultino centrate.

La seconda porta invece al *cambiamento in unità di misura*, per cui le variabili naturali sono trasformate in variabili ridotte adimensionali.

Variabili *centrate* e *ridotte* sono dette *codificate* e ne risultano di conseguenza stabiliti centro e passo di variazione (step).

$$X_{ij} = \frac{U_{ij} - \bar{U}_j}{\Delta U_j}$$

dove:

$X_{ij}$  è il valore della variabile codificata  $j$  nella  $i$ -esima prova

$U_{ij}$  è il valore della variabile naturale  $j$  nella  $i$ -esima prova

$\bar{U}_j$  è il valore della variabile naturale  $j$  al centro del dominio d'interesse

$\Delta U_j$  è il passo di variazione della variabile naturale  $j$ .

Convenzionalmente, nei disegni a due livelli, il livello basso di un fattore è codificato con -1 o -, il livello alto con +1 o + e quello intermedio tra i due (livello centrale) con 0. L'insieme delle diverse condizioni sperimentali è dato dalla *matrice sperimentale* che è un oggetto matematico che rappresenta sotto forma codificata gli esperimenti da effettuare [5]. Essa consiste in una tabella di dati costituita da  $N$  linee, corrispondenti a  $n$  esperimenti, e  $K$  colonne, corrispondenti alle  $k$  variabili studiate. L'elemento  $x_{ij}$  della matrice così formata corrisponde al valore che assume la  $j$ -esima variabile nell' $i$ -esimo esperimento.

Il *piano sperimentale* è invece la traduzione di una matrice sperimentale in variabili

naturali: si tratta di una tabella contenente dei dati espressi nelle loro unità di misura, direttamente utilizzabile dallo sperimentatore [5].

L'*effetto* di un fattore è il cambiamento nella risposta spostandosi dal livello 0 di quel fattore al livello 1.

Una *risposta*, indicata con  $y$ , è il risultato sperimentale di un'esperienza (tempo di analisi, resa di una reazione ecc.), cioè è una manifestazione misurabile di ciò che si osserva facendo variare i fattori studiati. Essa dipenderà quindi da  $k$  fattori e potremo scrivere

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k)$$

dove la funzione  $f$  è chiamata *funzione di risposta* ed è una funzione matematica di tipo polinomiale che descrive la risposta come funzione dei fattori. In generale è possibile rappresentare un problema di questo tipo in forma matriciale:

$$y = X\beta + \varepsilon$$

dove  $y$  è il vettore colonna delle  $n$  risposte,  $\beta$  è il vettore delle stime dei coefficienti,  $X$  è la matrice  $n \times k$  che definisce i punti sperimentali ed  $\varepsilon$  è il vettore colonna degli errori.

L'obiettivo dello sperimentatore è di trovare la dipendenza che esiste tra una risposta sperimentale e i fattori selezionati, cioè proporre e ottenere un *modello matematico* che leghi la risposta alle variabili [5].

Viene quindi postulato un modello sulla base delle conoscenze del ricercatore e si seleziona una matrice sperimentale che permetta di stimare correttamente i coefficienti del modello.

Il modello utilizzato potrà essere di diverso tipo:

-lineare senza interazioni

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad \text{dove } \varepsilon \text{ è l'errore sperimentale}$$

-lineare con interazioni di ordine  $k-1$  (con  $k$  variabili)

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \beta_{12} x_1 x_2 + \dots + \beta_{1k} x_1 x_k + \beta_{23} x_2 x_3 + \dots + \beta_{2k} x_2 x_k + \dots + \beta_{1jk} x_1 x_j x_k + \dots + \varepsilon \quad \text{con } j \neq k$$

-non lineare, comprendente cioè anche termini quadratici.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \beta_{12} x_1 x_2 + \dots + \beta_{1k} x_1 x_k + \beta_{11} x_1^2 + \dots + \beta_{kk} x_k^2 + \varepsilon$$

La scelta del modello è legata strettamente al dominio sperimentale [5]: più il dominio è piccolo, più il modello sarà semplice. Dalla scelta del modello dipenderanno il tipo di

informazione ottenuta, il numero e il tipo di esperimenti da condurre e quindi il tipo di pianificazione sperimentale. La matrice sperimentale dovrà infatti contenere come minimo un numero di esperimenti pari al numero di coefficienti da determinare.

Si hanno inoltre a disposizione dei *criteri di qualità* indipendenti dai risultati sperimentali che permettono di conoscere a priori con quale accuratezza saranno stimati i coefficienti e di apprezzare la qualità di una matrice sperimentale [5]. Di tali criteri si parlerà più diffusamente in seguito.

Dalla matrice sperimentale, nota l'equazione del modello, si ottiene la *matrice del modello* [5]. Questa è costituita da tante righe quanti sono gli esperimenti e da tante colonne quanti sono i termini presenti nell'equazione del modello. Nel caso di un modello lineare senza interazioni la matrice del modello differisce dalla matrice sperimentale per la sola colonna relativa al termine noto  $b_0$  la quale è costituita da tutti +1. Nel caso di un modello con interazioni si ha inoltre l'aggiunta di colonne relative a ciascuna interazione ottenute moltiplicando fra loro le colonne relative alle variabili di cui si vuole conoscere l'interazione.

Nota la matrice del modello è possibile calcolarne la sua trasposta  $X'$  (scambiandone le righe con le colonne) e quindi la *matrice di informazione*, data da  $X'X$ , la cui inversa è la *matrice di dispersione*  $(X'X)^{-1}$ , che risulta utile per il calcolo delle caratteristiche della matrice.

La matrice di dispersione compare anche nel calcolo dei coefficienti del modello (i coefficienti del modello  $\beta$  non sono affetti da errore, mentre i coefficienti  $b$  stima dei  $\beta$  sono comprensivi dell'errore sperimentale), che si ottengono per mezzo dell'analisi di regressione lineare multivariata applicando la formula seguente:

$$B = (X'X)^{-1} X'Y$$

dove  $B$  è il vettore delle stime  $b_j$ ,  $Y$  è il vettore risposte contenente le risposte ottenute dagli esperimenti effettuati secondo un'opportuna matrice sperimentale,  $X'$  è la trasposta della matrice del modello e  $(X'X)^{-1}$  è la matrice di dispersione.

Una volta che gli esperimenti sono stati effettuati e i coefficienti calcolati i risultati possono essere analizzati ed interpretati soprattutto attraverso test statistici. In particolare l'applicazione dei metodi statistici ai dati raccolti è resa possibile dal fatto che gli esperimenti vengono eseguiti secondo un'opportuna progettazione iniziale e quindi secondo adatte matrici.

L'importanza di una stima accurata dei coefficienti consiste nel fatto che questa consente di valutare l'effetto che ciascuna variabile ha singolarmente sulla risposta, oppure, nel caso di

un'interazione tra variabili, dell'effetto di tale interazione, od ancora, nel caso di un termine quadratico, dell'effetto quadratico della variabile. Si parla in particolare di *effetti principali*, suddivisibili in *lineari* e *quadratici*, e di *effetti di interazione* tra variabili. I primi danno informazioni sul peso esercitato dal termine in questione sulla risposta (o sulla curvatura del modello se si tratta di un termine quadratico); i secondi sono indice della interazione tra variabili e quindi dell'effetto che una variabile ha sull'effetto esercitato sulla risposta da un'altra variabile. Dal segno dei coefficienti si hanno invece informazioni su quale zona del dominio sperimentale offre i migliori risultati [6].

La rappresentazione grafica dell'equazione del modello è la *superficie di risposta*, definibile perciò come la rappresentazione della variazione della risposta nello spazio al variare dei diversi valori assunti dai fattori. La rappresentazione bidimensionale della superficie di risposta costituisce la *superficie di isorisposta* ed è rappresentata da linee concentriche lungo le quali la risposta si mantiene costante.

La *selezione della migliore strategia sperimentale* dovrà essere effettuata in conseguenza della definizione accurata e completa del problema [1], cioè valutando l'eventuale presenza di limitazioni sperimentali, il rischio di errore sistematico, il modo con cui viene stimato l'errore sperimentale, la necessità o meno di studiare tutti i fattori fin dall'inizio, e così via.

In generale nella prima fase del disegno sperimentale si potrà utilizzare un modello lineare senza interazioni in modo da valutare l'importanza di ogni variabile sulla risposta ed aggiustare il dominio sperimentale di ciascuna variabile, inizialmente piuttosto ampio, a seconda delle indicazioni ottenute. Grazie ad una fase di screening così concepita sarà quindi possibile attribuire il valore ottimale ad alcune variabili e restringere il dominio sperimentale delle variabili ancora in studio. In particolare le variabili fissate saranno quelle che in base ai valori dei coefficienti associati a ciascuna di esse risulteranno non influenti sulla risposta oppure influenti a tal punto da non avere dubbi circa il loro valore ottimale. Una volta ridotto il numero delle variabili si potrà condurre uno studio più approfondito del problema postulando un modello che descriva in modo più dettagliato il fenomeno e cioè che contenga termini rappresentativi delle interazioni tra variabili ed anche, nel caso che il numero delle variabili lo consenta, della curvatura del modello (termini quadratici) [6].

Una volta trovato il modello matematico, tale modello deve essere validato previsionalmente. Si procede dunque attraverso due fasi, e cioè una *fase di predizione*, nella quale si sostituiscono nell'equazione del modello i valori codificati delle variabili ottimizzate

predicendo in tal modo la risposta secondo il modello costruito, ed una *fase di convalida*. In quest'ultima si conduce l'esperimento nelle condizioni ottimizzate e si confronta la risposta ottenuta con la risposta prevista. In particolare si calcola l'intervallo di confidenza della risposta considerata per un certo numero di ripetizioni ed un certo numero di gradi di libertà. Si verifica quindi che il valore calcolato per la risposta ricada nell'intervallo di confidenza così costruito, evidenziando in questo modo un buon accordo tra la risposta ottenuta e quella calcolata dal modello.

### 3.1. Matrici

Le matrici di cui è stato fatto uso nella presente tesi sono descritte di seguito.

#### *Matrice di Hadamard o di Plackett-Burman*

Si tratta di una matrice di screening che consente di studiare  $k$  variabili con un numero limitato di esperimenti. Questo tipo di matrice permette di valutare i coefficienti di un modello lineare senza interazioni:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k$$

Il numero di esperimenti previsto da questa matrice è pari al più piccolo multiplo di quattro superiore al numero delle variabili (3 variabili, 4 esperimenti; 4 variabili, 8 esperimenti). Le variabili considerate possono essere sia qualitative che quantitative; i livelli sono rappresentati con  $-1$ ,  $+1$  o con  $-$ ,  $+$ .

In letteratura [7,8] sono riportate tutte le prime righe delle matrici di Plackett-Burman fino ad un numero di fattori pari a 100. Dalla appropriata prima riga si costruisce poi l'intera matrice per permutazione ciclica scrivendo come primo segno della riga successiva l'ultimo segno della precedente e di seguito il blocco dei segni della riga precedente rimasti. Questa regola vale fino alla penultima riga, mentre l'ultima è costituita da tutti segni meno.

#### *Disegno di Doehlert*

Il disegno di Doehlert permette di studiare le variabili a più di due livelli, il che consente di indagare circa l'eventuale presenza di curvatura nel modello ed eventualmente di stimare i coefficienti relativi agli effetti quadratici  $b_{ii}$  di un modello quadratico del tipo

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k + b_{12}x_1x_2 + \dots + b_{1k}x_1x_k + b_{11}x_1^2 + \dots + b_{kk}x_k^2$$

Questo tipo di disegno prevede un numero di esperimenti pari a  $k^2+k+n$ , dove  $k$  è il numero delle variabili e  $n$  è il numero di esperimenti condotti al centro del dominio sperimentale [10].

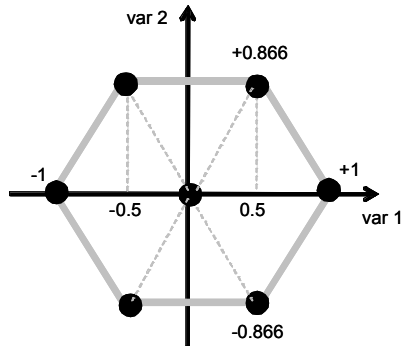


Fig. 3.1. Disegno di Doehlert per due variabili.

Il Doehlert è una figura geometrica, in genere è chiamata solido di Doehlert, che nel caso di due variabili è un esagono (Fig. 3.1.). I vertici di tale figura individuano gli esperimenti da effettuare. Tale disegno consiste di punti uniformemente spazati su sfere concentriche [4,10]; i punti sono generati a partire da un simplex regolare [5].

"Simplex" è un termine che indica una figura geometrica con  $k+1$  vertici in uno spazio a  $k$  dimensioni dove  $k$  corrisponde al numero dei fattori.

Nel Doehlert le variabili sono studiate a 3, a 5 e a 7 livelli: in generale, nel caso di  $k$  variabili, una variabile è studiata a 3 livelli, una è studiata a 5 livelli e le  $k-2$  variabili restanti sono studiate a 7 livelli.

La disposizione uniforme dei punti sperimentali nello spazio delle variabili codificate consente di coprire tutto il dominio sperimentale e di ottenere dunque una qualità costante della previsione della risposta, che rende queste matrici indicate per la costruzione di un modello previsionale. Un'altra proprietà è la loro facoltà di estensione in una direzione

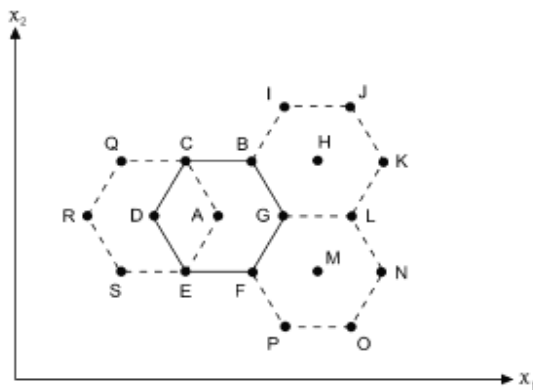


Fig. 3.2. Disegno di Doehlert per due fattori con tre possibili disposizioni nel dominio sperimentale

qualunque del dominio sperimentale. Se i risultati di una prima sperimentazione lasciano apparire la necessità di spostare il dominio d'interesse, è possibile riutilizzare i punti sperimentali limitrofi alla nuova zona da esplorare traslando il Doehlert verso la direzione di risposta ottimale (metodo sequenziale) (Fig. 3.2.) [9]. Se al contrario la conoscenza di una regione del dominio studiato deve essere più dettagliata, si ridurranno le dimensioni del

Doehlert. Inoltre, nel corso dello studio è possibile introdurre dei nuovi fattori, purché questo sia stato previsto e tali fattori siano stati fissati ad un livello medio all'inizio della sperimentazione [5].

### ***Central Composite Design (CCD)***

Il composite design è un disegno fattoriale a due livelli ampliato con ulteriori punti sperimentali al fine di studiare le variabili a più di due livelli [6]. Tale disegno permette la stima dei coefficienti di un modello quadratico di tipo:

$$y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum \sum b_{ij} x_i x_j \text{ (con } i, j = 1, 2, \dots, k)$$

e richiede un numero di esperimenti pari a  $2^k + 2k + n$ , dove  $k$  rappresenta il numero delle variabili e  $n$  il numero di esperimenti condotti al centro del dominio sperimentale. Il numero degli esperimenti necessari aumenta rapidamente con il numero delle variabili studiate.

Il disegno consiste di tre parti [6]:

- un disegno fattoriale saturo ( $2^k$ ) o frazionario ( $2^{k-p}$ ) usato per stimare i coefficienti dei termini lineari ( $b_i$ ) e di interazione ( $b_{ij}$ ) del modello (punti a distanza  $\pm 1$  dal centro del dominio sperimentale)

- $n$  esperimenti al centro del dominio sperimentale che permettono di ottenere una stima della varianza sperimentale

- $2k$  esperimenti simmetricamente spazati a  $\pm\alpha$  lungo l'asse relativo ad ogni variabile, cioè punti le cui proiezioni cadono al centro delle iperfacce dell'ipercubo che rappresenta le dislocazioni nello spazio dei fattori degli esperimenti del disegno fattoriale completo. Questi punti sperimentali, detti punti assiali o punti star, hanno quindi livello  $\pm\alpha$  in un fattore e livello 0 negli altri. Gli esperimenti all'estremità della stella sono usati per stimare i coefficienti dei termini quadratici ( $b_{ii}$ ) nel modello. In generale, il valore assunto da  $\alpha$  dipende dal numero di esperimenti nella parte fattoriale del CCD. Più in particolare, nel caso di due variabili  $\alpha$  è uguale a 1.414 (diagonale del quadrato di lato 1), nel caso di tre variabili è uguale a 1.682 (diagonale del cubo di lato 1) (Fig. 3.3.).

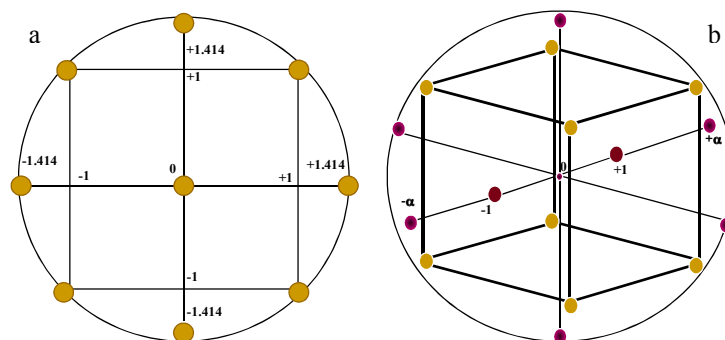


Fig. 3.3. Central Composite Design per 2 (a) e per 3 (b) fattori.

### ***Disegno D-ottimale (D-Optimal)***

La teoria del disegno D-ottimale fornisce un particolare approccio alla scelta di un disegno sperimentale. Ha lo scopo di minimizzare la varianza delle stime dei coefficienti del modello ipotizzato [4] e permette di ottenere la stima di tali coefficienti con il minor numero di esperimenti e la migliore qualità dell'informazione possibili.

Si può dimostrare che la varianza delle stime dei coefficienti del modello,  $\text{var}(B)$ , è pari a  $\sigma^2(X'X)^{-1}$ . Inoltre la varianza della risposta predetta ad ogni combinazione di valori delle variabili è anch'essa una funzione di  $(X'X)^{-1}$ , ovvero della matrice di dispersione.

Quindi, un modo efficace per scegliere dei buoni valori per gli elementi di  $X$  è sceglierli in modo che  $(X'X)^{-1}$  sia "piccola". Sono stati sviluppati diversi criteri che permettono di ottenere ciò, e tra questi in particolare il criterio di D-ottimalità, che consiste nel minimizzare il determinante della matrice di dispersione [11].

Per applicare il disegno D-ottimale e scegliere un set di esperimenti a partire da una matrice originaria deve essere specificato il numero minimo e massimo di punti sperimentali che si desidera esaminare ed un iniziale set arbitrario di esperimenti. Attraverso una procedura di tipo iterativo, questo iniziale set è modificato aggiungendo e cancellando esperimenti in modo da minimizzare il determinante della matrice di dispersione. Si ottengono diverse matrici con un diverso numero di esperimenti e caratterizzate da diversi parametri, tra cui appunto il determinante della matrice di dispersione, ed è così possibile selezionare la matrice che presenta il miglior compromesso tra la qualità dell'informazione ottenuta ed il numero di esperimenti da eseguire.

## **3.2. Criteri di qualità**

I criteri di qualità delle matrici consentono di conoscere a priori, cioè prima di condurre gli esperimenti, con quale accuratezza saranno stimati i coefficienti e quindi di valutare la qualità delle matrici per stabilire quale sia più adatta allo scopo.

In generale, le stime dei coefficienti devono essere accurate e non correlate tra loro. La stima  $b_i$  del coefficiente  $\beta_i$  è definita accurata se l'intervallo centrato su  $b_i$ , nel quale con una certa probabilità si trova il valore vero del coefficiente, è il più piccolo possibile; la varianza della stima  $\text{var}(b_i)$  misura tale intervallo. Due stime  $b_i$  e  $b_j$  sono non correlate se sono calcolate in maniera indipendente.



È quindi possibile assegnare dei limiti di confidenza ad ogni coefficiente e prendere in considerazione tutti i fattori contemporaneamente [12], per cui i limiti della regione di confidenza di tutti i coefficienti stimati (*joint confidence region*) sono definiti da un iperellissoide nello spazio dei coefficienti. Tale iperellissoide di confidenza è centrato sul vettore  $B$ , cioè sul vettore stima dei coefficienti  $b$ . L'iperellissoide si riduce ad un'ellisse nel caso che i coefficienti siano solo due. Le caratteristiche di questo iperellissoide, quali la sua orientazione ed estensione, possono essere usate come criteri per valutare la qualità della stima dei coefficienti. Tali aspetti dipendono a loro volta dalle proprietà della matrice di dispersione  $(X'X)^{-1}$ .

Il *volume* dell'iperellissoide traduce l'accuratezza globale della stima dei coefficienti; per un data probabilità, più l'iperellissoide è piccolo, migliori sono le stime. La *forma* dell'iperellissoide è legata all'accuratezza con la quale è determinata ogni stima. Perché l'accuratezza nella stima dei coefficienti sia la stessa per tutti i coefficienti, la forma dell'iperellissoide deve essere quella di un'ipersfera. L'*orientazione* dell'iperellissoide indica il grado di correlazione fra le stime dei coefficienti. Le stime dei coefficienti risultano indipendenti se gli assi principali dell'iperellissoide sono paralleli agli assi dei coefficienti [12].

Ad esempio, il D-optimal design si basa sul criterio del volume dell'iperellissoide, che è proporzionale alla radice del determinante della matrice di dispersione

$$V = a |(XX')^{-1}|^{1/2}$$

Questo criterio è definito come *criterio del determinante (D)*:

$$D(\xi) = |(XX')^{-1}|$$

Più il determinante della matrice di dispersione è piccolo, minore è il volume dell'iperellissoide e quindi più accurata è la stima dei coefficienti.

### 3.3. Analisi della varianza e analisi statistica dei coefficienti

L'analisi della varianza (ANOVA) è una tecnica statistica usata per analizzare i risultati che dipendono dalla simultanea variazione di un certo numero di fattori. Nel disegno sperimentale tale tecnica può essere usata per valutare la significatività e la validità del modello di regressione assunto [13].

La varianza totale  $SS$ , espressa come somma dei quadrati (*Sum of Squares*) delle

deviazioni dalla media, viene suddivisa nelle componenti corrispondenti alle varie sorgenti di variazione presenti nei dati,  $SS_{reg}$  e  $SS_{resid}$ , la prima dovuta alla regressione e la seconda ai residui [14]:

$$SS = SS_{reg} + SS_{resid}$$

dove  $SS = \sum (y_i - \bar{y})^2$ ,  $SS_{reg} = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2$ ,  $SS_{resid} = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2$ ,  $y_i$  sono le risposte,  $\bar{y}$  è la media delle risposte,  $\hat{y}_i$  sono le risposte predette dal modello.

Se sono disponibili delle repliche degli esperimenti, la componente dei residui può essere ulteriormente suddivisa in  $SS_{lof}$  e in  $SS_{pe}$ , rispettivamente correlate alla perdita di aderenza rispetto al modello (*lack of fit*) e al puro errore sperimentale [14]:

$$SS_{resid} = SS_{lof} + SS_{pe}$$

dove  $SS_{pe} = \sum (y_i - \bar{y}_i)^2$  e  $\bar{y}_i$  è la media delle risposte ottenute nelle stesse condizioni sperimentali in cui sono state effettuate le repliche.

Le varie somme dei quadrati relative alle diverse sorgenti di variazione sono quindi divise per i gradi di libertà corrispondenti, in modo da ottenere i quadrati medi.

Infine, i quadrati medi vengono confrontati tra di loro attraverso opportuni test statistici. In generale in un test statistico viene definita un'ipotesi nulla  $H_0$  ed un'ipotesi alternativa  $H_1$  specificando il livello di significatività; quindi si prende la decisione di rifiutare l'ipotesi nulla  $H_0$  o di accettarla in base a regole che si fondano sul livello di significatività.

In particolare nell'ANOVA viene effettuato l' $F$ -test, detto test del rapporto della varianza (*variance ratio test*). In questo caso vengono calcolati i rapporti dei quadrati medi tra diverse sorgenti di variazione ottenendo i rapporti  $F$ , che vengono confrontati (test unilaterale destro) con un  $F$  critico tabulato ( $F_{crit}$ ). Se  $F < F_{crit}$  l'ipotesi nulla è accettata con una probabilità di assumere un'ipotesi nulla falsa pari a  $\alpha/2$ . Se  $F > F_{crit}$  l'ipotesi nulla è rifiutata con una probabilità di rifiutare un'ipotesi nulla vera pari a  $\alpha/2$  [4].

Riassumendo, la tabella dell'ANOVA è del tipo sotto riportato, dove  $p$  è il numero di coefficienti da stimare,  $n$  è il numero totale di esperimenti effettuati,  $f$  è il numero delle differenti combinazioni dei fattori.

| Sorgente di variazione | Somma dei quadrati                        | Gradi di libertà | Quadrati medi    | Rapporto $F$                              |
|------------------------|---|------------------|------------------|---|
| Regressione            | $SS_{reg} = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2$ | $p-1$            | $SS_{reg} / p-1$ | $\frac{SS_{reg} / p-1}{SS_{resid} / n-p}$ |

|          |   |       |   |
|----------|---|-------|---|
| Residui  | $SS_{resid} = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2$ | $n-p$ | $SS_{resid}/n-p$                                  |
| Validità | $SS_{lof} = SS_{resid} - SS_{pe}$       | $f-p$ | $\frac{SS_{lof}}{f-p} \bigg/ \frac{SS_{pe}}{n-f}$ |
| Errore   | $SS_{pe} = \sum (y_i - \bar{y}_i)^2$    | $n-f$ | $SS_{pe}/n-f$                                     |

---

### ***Significatività del modello***

Nel test di significatività l'obiettivo è decidere se i coefficienti del modello sono significativi. Secondo l'ipotesi nulla  $H_0$  i coefficienti del modello non apportano informazioni alla descrizione del fenomeno, mentre secondo l'ipotesi alternativa  $H_1$  i coefficienti del modello apportano informazioni (senza evidenziare però quali siano i coefficienti significativi) [4].

In questo caso l'ipotesi nulla  $H_0$  prevede che la varianza dei dati non sia spiegata dai fattori presenti nel modello, per cui i rapporti  $F$  relativi a regressione e residui non sono significativamente diversi tra loro.

$$H_0: \beta_1 = \dots = \beta_p = 0$$

Affinché il modello sia significativo occorre che  $F > F_{crit}$ , in modo da accettare l'ipotesi alternativa  $H_1$  secondo la quale uno o più coefficienti del modello sono significativi.

### ***Validità del modello***

Per valutare la validità del modello, ovvero valutare se il modello scelto descrive bene il fenomeno in studio, il numero di esperimenti deve essere maggiore del numero dei coefficienti del modello ed inoltre devono essere effettuate delle repliche per ottenere una stima della varianza sperimentale [13]. Questa stima, effettuata ad un dato set di livelli dei fattori, è in realtà una misura della varianza sperimentale in tutto il dominio studiato; infatti, per poter applicare la regressione lineare multipla occorre essere in condizioni di omoscedasticità, cioè di varianza sperimentale costante nel dominio. Un altro metodo per ottenere questa stima è quello di duplicare ogni esperimento del disegno [11].

Occorre quindi verificare l'ipotesi nulla  $H_0$  secondo la quale il rapporto  $\frac{SS_{lof}}{f-p} \bigg/ \frac{SS_{pe}}{n-f}$  è uguale a 1, cioè il *lack of fit* è paragonabile all'errore puramente sperimentale. Il modello risulta valido se  $F < F_{crit}$ ; se  $F > F_{crit}$   $H_0$  è rifiutata, ovvero esiste una significativa perdita di aderenza tra modello e dati [14].

### ***Analisi statistica dei coefficienti***

Lo scopo dell'analisi statistica dei coefficienti è capire se l'effetto  $b_k$  del fattore  $k$  è significativo o no; in altre parole, verificare se le risposte ai diversi livelli di  $k$  sono significativamente diverse. In questo caso, l'ipotesi nulla  $H_0$  prevede  $\beta_k=0$ , mentre l'ipotesi alternativa  $H_1$  prevede  $\beta_k \neq 0$ .

È possibile costruire un intervallo di confidenza (noto il  $t$  di Student) intorno a  $b_k$  in modo che ci sia una data probabilità che l'intervallo contenga il valore vero  $\beta_k$ . Per far questo occorre valutare la deviazione standard della stima del coefficiente  $b_k$ , chiamata errore standard  $s_{b_k}$ , la quale può essere calcolata dalla matrice di dispersione  $(X'X)^{-1}$  se è disponibile una stima della varianza sperimentale,  $\sigma_{pe}^2$ .

$$\text{Var}(B) = [\sigma_{pe}^2 (X'X)^{-1}] \quad \sigma_{b_k}^2 = \sigma_{pe}^2 c^{kk} \quad \text{dove } c^{kk} \text{ è il coefficiente di varianza.}$$

Calcolati  $b_k$  e  $s_{b_k}$ , se tale intervallo include il valore zero viene accettata l'ipotesi nulla  $H_0$  secondo la quale  $\beta_k=0$ . In caso contrario si accetta l'ipotesi alternativa  $H_1$  che  $\beta_k$  sia significativamente diverso da zero [13].

In altre parole, un coefficiente  $b_k$  è significativo se il rapporto tra il coefficiente  $b_k$  e il suo errore standard  $s_{b_k}$  è maggiore del valore del  $t$  di Student tabulato ad un certo numero  $v$  di gradi di libertà e ad una data probabilità [11].

### **3.4. Disegno di miscele**

Il disegno sperimentale di miscele viene utilizzato quando si assume che la risposta misurata dipenda solo dalle proporzioni relative dei componenti presenti nella miscela [2]. Tale disegno è uno speciale tipo di studio della superficie di risposta in cui i fattori sono i costituenti della miscela e la risposta è funzione delle percentuali di ognuno di questi costituenti. In particolare, in campo farmaceutico questo approccio è adatto per diversi problemi di miscelazione (ad esempio, progettazione di una nuova formulazione) e permette sia la valutazione con il minimo numero di esperimenti degli effetti dei cambiamenti nella composizione delle miscele sia la scelta della composizione ottimale [2,15-18].

La caratteristica peculiare del disegno di miscele consiste nel fatto che non è possibile variare le percentuali dei singoli componenti in modo indipendente l'uno dall'altro, dato che

la loro somma deve essere pari al 100%. Di conseguenza i fattori sono espressi come frazione dell'ammontare totale e i loro range sperimentali variano tra 0% e 100% [2,6,19].

Ad esempio, una miscela a tre componenti viene rappresentata da un triangolo, sezione bidimensionale di uno spazio tridimensionale, a sua volta rappresentato da un cubo (Fig. 3.4.) [3].

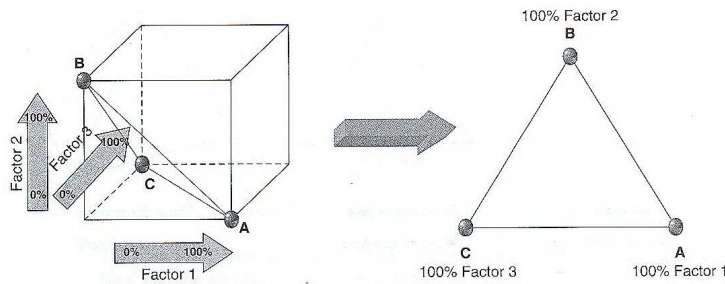


Fig.3.4. Rappresentazione spaziale di una miscela a tre componenti.

Il triangolo mostra appunto la regione permessa in cui la somma delle proporzioni dei tre componenti è pari al 100%. I punti del triangolo rappresentano le possibili miscele: i tre vertici

corrispondono ai singoli componenti; i punti sul perimetro corrispondono a miscele binarie; i punti interni al triangolo corrispondono a miscele ternarie. Il centro del triangolo corrisponde ad una uguale proporzione di tutti i componenti [3].

Con l'aumento del numero dei componenti, aumenta la dimensionalità dello spazio; infatti, per una miscela di  $n$  componenti la dimensionalità dello spazio è pari a  $n-1$ . Quindi, se per tre componenti lo spazio delle miscele è un triangolo, per quattro componenti è un tetraedro. Queste figure geometriche sono definite *simplex* e corrispondono ai più semplici oggetti possibili in uno spazio di data dimensionalità [3].

Anche se teoricamente ogni componente può variare tra 0 e 100%, in pratica spesso vengono applicate delle limitazioni alle proporzioni dei costituenti della miscela per attenersi alle percentuali dei componenti effettivamente utilizzate. In generale, le limitazioni imposte delimitano, all'interno della figura definita dai componenti, una regione sperimentale rappresentata da un poliedro (spazio dei fattori limitato) (Fig. 3.5.) [2,3].

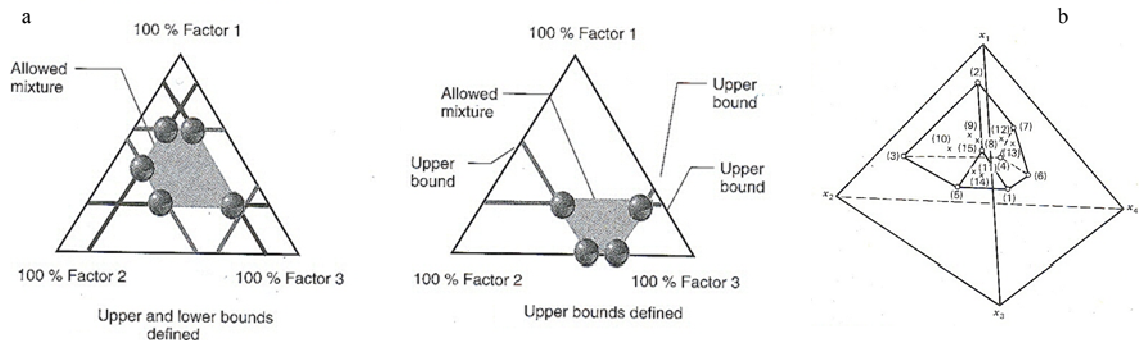


Fig.3.5. Esempi di particolari situazioni riscontrabili nel caso di miscele costituite da tre (a) e quattro componenti (b).

Nel disegno sperimentale di miscele vengono utilizzati specifici modelli matematici e specifiche matrici sperimentali [2,6].

I possibili modelli che correlano la risposta con i componenti sono diversi. Considerando per semplicità tre componenti, è possibile usare un modello di primo ordine in cui vengono valutati gli effetti dei costituenti puri:

$$y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \varepsilon$$

Con un modello più complesso come quello di secondo ordine vengono valutate anche le miscele binarie:

$$y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \varepsilon$$

È possibile scegliere un modello di ordine ancora superiore, normalmente di terzo ordine. La forma canonica del modello di terzo ordine completo è relativamente complessa e il numero di coefficienti da stimare è alto:

$$y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \gamma_{12} x_1 x_2 (x_1 - x_2) + \gamma_{13} x_1 x_3 (x_1 - x_3) + \gamma_{23} x_2 x_3 (x_2 - x_3) + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 + \varepsilon$$

Comunque, è possibile omettere alcuni termini e ottenere un modello, detto cubico speciale, in cui oltre all'effetto dei componenti puri sono valutati gli effetti di miscele binarie e ternarie:

$$y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 + \varepsilon$$

Questo modello per un sistema a tre componenti è costituito da sette termini. I primi tre rappresentano il modello lineare, ciascun coefficiente indica l'effetto che ogni singolo componente ha sulla risposta. I tre termini successivi rappresentano invece gli effetti delle miscele binarie e, insieme ai termini lineari, formano il modello quadratico. Infine è presente il termine relativo all'effetto della miscela ternaria, solitamente importante per sistemi che hanno i valori di massimo o di minimo all'interno del triangolo delle concentrazioni [9].

Per selezionare un modello che descriva bene il fenomeno in studio, la strategia comunemente seguita è il metodo *step-wise*, che consiste nel considerare inizialmente modelli più semplici e se necessario progressivamente modelli sempre più complessi. Dapprima si ipotizza quindi un modello di primo ordine che viene convalidato attraverso i cosiddetti punti test, esperimenti che in questo caso corrispondono a miscele binarie. Se le risposte misurate in

questi punti non sono statisticamente diverse dalle risposte predette usando il modello ipotizzato, il modello è valido e rappresenta bene il fenomeno. In caso contrario, il modello non è valido e deve essere preso in considerazione un modello di secondo ordine. L'aggiunta dei punti test al disegno originario fornisce un disegno che risulta ottimale per stimare un modello di secondo ordine. Questo viene a sua volta convalidato utilizzando in genere come punto test una miscela ternaria con uguali proporzioni dei tre componenti. Se anche il modello di secondo ordine non rappresenta bene i dati, si può utilizzare un modello speciale cubico. La convalida di quest'ultimo prevede altre miscele ternarie. Gli esperimenti relativi ai punti test devono essere condotti in ordine randomizzato insieme con gli esperimenti del disegno in modo da ottenere una distribuzione casuale di eventuali piccoli e non noti errori sistematici [6].

Mentre la validità del modello viene quindi in generale valutata attraverso l'analisi dei residui usando i punti test, la significatività del modello viene valutata attraverso l'analisi della varianza [6]. Anche questa, come i modelli, mostra alcune differenze da quella per variabili indipendenti, dato che vi sono particolari limitazioni al modello e che i coefficienti non sono indipendenti [6].

Il disegno probabilmente più utilizzato per stimare i coefficienti del modello è il disegno di Scheffé simplex centroide, che per  $k$  fattori definisce  $2^{k-1}$  esperimenti. Nel caso di tre componenti, questo può essere costruito sequenzialmente con tre esperimenti che corrispondono alle tre sostanze pure che servono alla stima del modello di primo ordine, tre miscele binarie (per il modello di secondo ordine), una miscela ternaria (per il modello cubico speciale), per un totale di 7 esperimenti a cui vengono aggiunti gli eventuali punti test (Tab. 3.1.).

|    | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> |
|----|----------------|----------------|----------------|
| 1  | 1              | 0              | 0              |
| 2  | 0              | 1              | 0              |
| 3  | 0              | 0              | 1              |
| 4  | 1/2            | 1/2            | 0              |
| 5  | 1/2            | 0              | 1/2            |
| 6  | 0              | 1/2            | 1/2            |
| 7  | 1/3            | 1/3            | 1/3            |
| 8  | 2/3            | 1/6            | 1/6            |
| 9  | 1/6            | 2/3            | 1/6            |
| 10 | 1/6            | 1/6            | 2/3            |

Tab 3.1. Matrice sperimentale corrispondente a un disegno di Scheffé per 3 fattori.

Nella fig. 3.6. è riportata la posizione degli esperimenti del disegno di Scheffé simplex centroide per tre componenti e per quattro componenti [6].

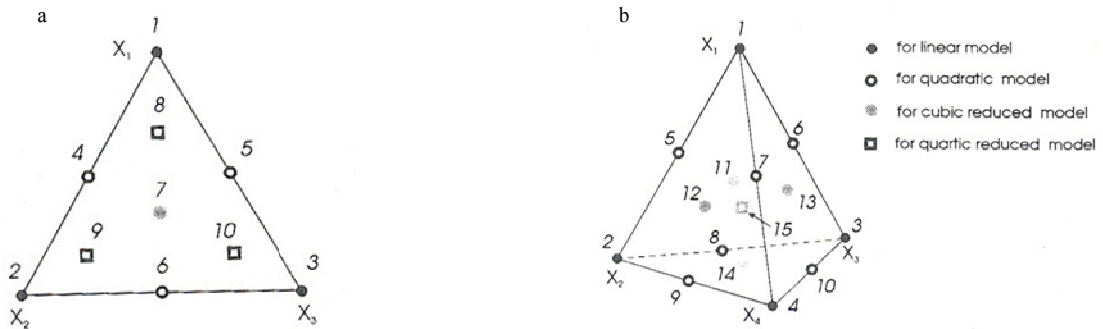


Fig. 3.6. Rappresentazioni della posizione degli esperimenti per un disegno di Scheffé per 3 (a) e 4 (b) componenti.

Se vi sono delle limitazioni nelle proporzioni dei componenti, le coordinate del poliedro originale definito dai componenti originali ( $x_i$ ) devono essere ridefinite in termini di pseudocomponenti ( $x'_i$ ), che sono combinazioni dei componenti originali. Alcuni vantaggi del loro uso consistono nel fatto che la costruzione dei disegni risulta più semplice e la qualità descrittiva (*fitting*) dei modelli risulta migliore che nel sistema dei componenti originali. Questa trasformazione (fig. 3.7.) è simile all'introduzione delle variabili codificate al posto delle variabili originali nel classico disegno sperimentale per fattori indipendenti [2]. La formula usata per trasformare i componenti in pseudocomponenti è la seguente:

$$x'_i = \frac{x_i - a_i}{1 - \sum a_i}$$

dove  $x'_i$  è il valore dello pseudocomponente,  $x_i$  è il valore del componente nella matrice sperimentale e  $a_i$  è il limite inferiore.

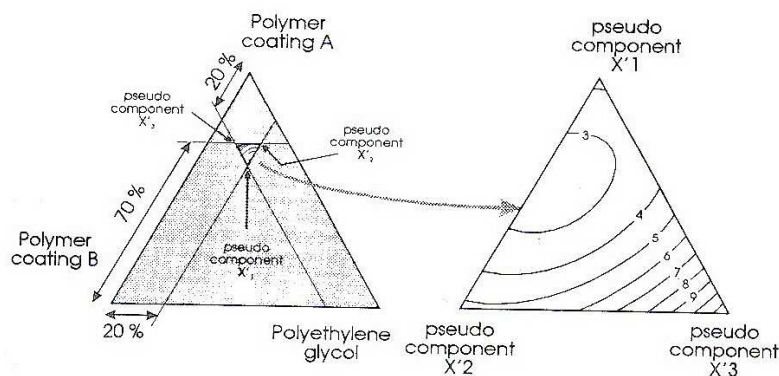


Fig. 3.7. Esempio di trasformazione da componenti a pseudocomponenti nel caso dell'ottimizzazione di un rivestimento per compresse [6].



Una volta ottenuto un modello valido e significativo, questo può essere usato in modo predittivo attraverso l'esame di superfici di risposta bidimensionali o tridimensionali. Da questi grafici, che coprono il completo spazio sperimentale della miscela, è possibile trovare la miscela ottimale per il problema considerato. In particolare, l'uso delle curve di isorisposta permette una interpretazione dei risultati molto semplice, come evidenziabile dalla fig. 3.7.

Inoltre, per valutare meglio il contributo di ognuno dei componenti è possibile applicare il metodo della traccia della risposta [2]. Si tratta di un grafico in cui viene mostrato il cambiamento nella risposta stimata dovuto al cambiamento della percentuale di un singolo componente, mantenendo gli altri componenti ad un valore fissato. Una volta scelta la miscela di riferimento (normalmente il centroide della regione sperimentale), il grafico mostra la variazione della risposta stimata allontanandosi dalla miscela di riferimento lungo gli assi del componente considerato.

## 4. ELETTROFORESI CAPILLARE

### 4.1. Principi generali

L'elettroforesi capillare (*capillary electrophoresis*, CE) è una tecnica analitica separativa che unisce alte prestazioni a bassi costi di gestione.

La separazione avviene in un capillare di silice fusa rivestito di poliimmide, di diametro

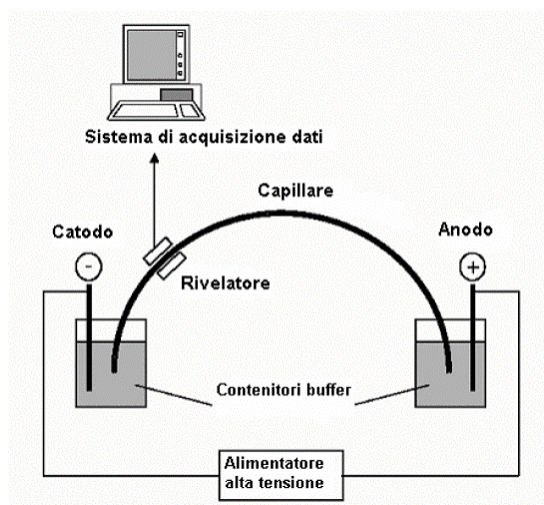


Fig. 4.1. Schema di un sistema CE

10-100  $\mu\text{m}$ , riempito con un tampone definito *background electrolyte* (BGE), alle cui estremità si trovano due elettrodi a cui è applicata una differenza di potenziale. Il campo elettrico generato fa sì che gli analiti carichi migrino con velocità diverse a seconda delle loro caratteristiche chimico-fisiche raggiungendo l'estremità del capillare dove è posto il rivelatore (fig. 4.1.) [32,34].

La forza elettrica ( $F_E$ ), che provoca il movimento degli ioni, è proporzionale alla carica  $q$  e al campo elettrico incidente  $E$  secondo la relazione  $F_E = qE$ . A questa si oppone la forza frizionale  $F_F = -6\pi\eta rv$ , dove  $\eta$  è la viscosità del mezzo,  $r$  e  $v$  rispettivamente il raggio e la velocità dello ione. Durante la corsa elettroforetica si ha il bilanciamento di queste due forze, per cui  $qE = -6\pi\eta rv$ . La velocità di uno ione è data quindi da  $v = \frac{qE}{6\pi\eta r}$  [35]. La grandezza

$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r}$  è definita mobilità elettroforetica e da questa espressione risulta che specie di piccole dimensioni e fortemente cariche presentano un'elevata mobilità, al contrario di specie più grandi e poco cariche che hanno una bassa mobilità [36]. In realtà, la mobilità così calcolata differisce quasi sempre da quella determinata sperimentalmente, detta mobilità elettroforetica effettiva. Quest'ultima dipende da diversi altri parametri come la solvatazione, la temperatura, la forza ionica, il pH, la composizione del BGE e così via [35].

### ***Flusso elettroosmotico***

La superficie interna del capillare in condizioni di pH superiori a 3 si carica negativamente a causa della presenza dei gruppi silanolici [32]. Questo fa sì che le cariche positive del BGE diano origine ad un doppio strato adiacente alla parete. Il primo strato, detto strato fisso o strato di Stern, è costituito solo da cationi ed è caratterizzato da una scarsa mobilità perché saldamente adsorbito ai gruppi silanolici. Il secondo strato, lo strato diffuso o strato di Gouy-Chapman, a prevalenza cationica, è costituito da cariche che possiedono una maggiore mobilità e che si scambiano continuamente con quelle presenti nel resto della soluzione (fig. 4.2. (a)). Applicando la differenza di potenziale, le cariche dello strato diffuso migrano verso il catodo trascinando anche le molecole d'acqua che le solvatano e generando un flusso netto dall'anodo al catodo, definito flusso elettroosmotico (*electroosmotic flow*, EOF) (fig. 4.2. (b)) [32,37].

Il profilo del flusso elettroosmotico è piatto e quindi diverso da quello parabolico che si ottiene in HPLC (fig. 4.3.); ne derivano benefici ai fini dell'efficienza, perché la forza motrice del flusso è uniformemente distribuita lungo il capillare e la diffusione radiale è trascurabile [37].

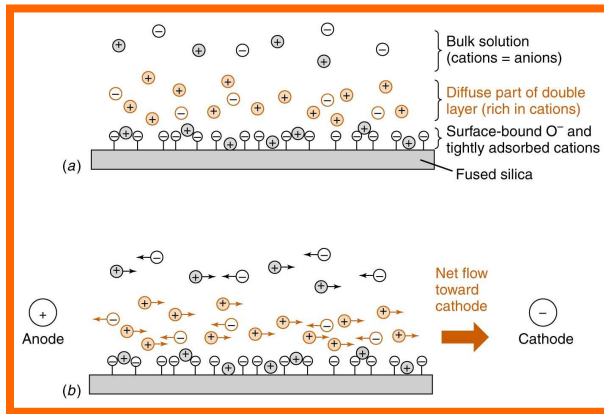


Fig. 4.2. Doppio strato di cariche positive sulla parete interna del capillare (a) e formazione del flusso elettroosmotico (b).

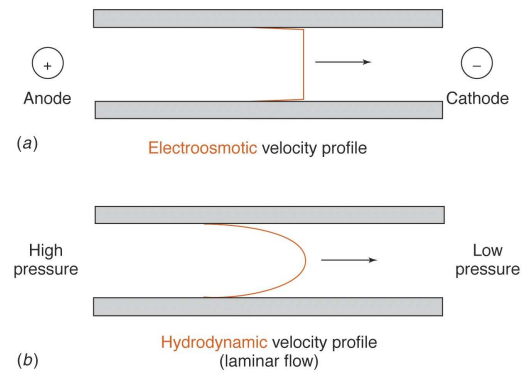


Fig. 4.3. Profilo piatto del flusso elettroosmotico in CE (a) e profilo parabolico del flusso laminare in HPLC (b).

È possibile quindi definire una velocità elettroosmotica  $v_{eof} = \mu_{eof} E$ , proporzionale al campo elettrico incidente. La mobilità elettroosmotica  $\mu_{eof}$  viene descritta dalla formula  $\mu_{eof} = \varepsilon \zeta / 4\pi \eta$ , dove  $\varepsilon$  è la costante dielettrica,  $\eta$  è la viscosità del mezzo e  $\zeta$  è il potenziale zeta [34]. Quest'ultimo è definito come la differenza di potenziale tra la superficie del capillare e l'inizio dello strato diffuso del doppio strato. Il flusso elettroosmotico dipende fortemente dal pH del tampone, perché variando il pH si modifica l'espressione delle cariche negative dei gruppi silanici e quindi si modifica il potenziale  $\zeta$  (fig. 4.4.) [32,34,35].

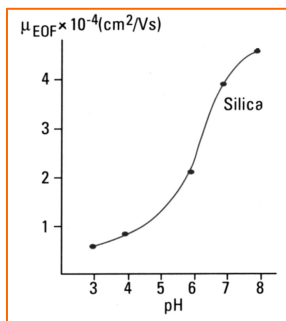


Fig. 4.4. Mobilità dell'EOF in funzione del pH.

La mobilità apparente  $\mu_{app}$  dei soluti è la somma della mobilità elettroosmotica e della mobilità elettroforetica effettiva secondo la relazione  $\mu_{app} = \mu_{eof} + \mu_{eff}$ . La velocità apparente è quindi  $v_{app} = \mu_{app} E$  [38]. Per le molecole cariche positivamente, l'azione del flusso elettroosmotico si somma a quella derivante dall'attrazione verso il catodo. I soluti carichi negativamente, che invece spontaneamente sarebbero attratti dall'anodo, vengono ugualmente trasportati verso il catodo anche se con una velocità inferiore rispetto a quelli cationici. Infatti la grandezza del flusso elettroosmotico può essere più di un ordine di grandezza superiore alla mobilità elettroforetica dei soluti anionici. Le sostanze neutre sono trasportate verso il catodo alla stessa velocità del flusso elettroosmotico, giungendo tutte insieme al rivelatore; per poterle analizzare separatamente occorre applicare particolari modalità operative della CE. Quindi, in un'ipotetica corsa elettroforetica in presenza di flusso elettroosmotico, con tre molecole di cui una positiva, una neutra e una negativa, si ha per prima la rivelazione della molecola carica

positivamente, poi la rivelazione di quella neutra insieme al flusso elettroosmotico e per ultima viene rivelata la molecola negativa [35].

### ***Iniezione del campione***

I metodi utilizzati per il campionamento sono due: iniezione idrodinamica ed elettrocinetica. La prima consiste nell'applicare una pressione all'inizio del capillare o una depressione nella parte terminale di una certa entità e durata, così da far defluire all'interno del capillare un piccolo volume della soluzione del campione  $V_c$ . Il volume iniettato, dell'ordine dei nL, può essere calcolato attraverso l'equazione di Poiseuille:

$$V_c = \frac{\Delta P \pi d^4 t}{128 \eta L_t}$$

dove  $\Delta P$  è la differenza di pressione tra le estremità del capillare,  $d$  è il diametro interno del capillare,  $t$  è il tempo di iniezione,  $\eta$  è la viscosità del campione,  $L_t$  è la lunghezza totale del capillare [39].

Il metodo dell'iniezione elettrocinetica consiste invece nell'applicare una piccola differenza di potenziale al capillare per un periodo di tempo prestabilito, così da caricare una parte del campione attraverso la migrazione degli ioni. Questo metodo porta una componente di variabilità maggiore rispetto a quello idrodinamico perché la quantità effettiva di campione iniettata dipende dalla mobilità degli ioni presenti nel campione: ioni con più alta mobilità sono campionati in maggiore quantità. Per questo viene principalmente utilizzato per elettroforesi capillare a scopo qualitativo o per elettroforesi su gel [35].

Con entrambi i metodi di iniezione, per aumentare l'efficienza di separazione e la sensibilità di rivelazione, può essere adottata una tecnica di preconcentrazione on-line del campione, il *sample stacking* [32,37]. Lo stacking dipende dalla relazione tra il campo elettrico nella zona del campione iniettato e nell'elettrolita di supporto che lo circonda. L'effetto di restringimento della zona del campione è da attribuire al fatto che il campo elettrico dipende inversamente dalla conduttività. Poiché in generale il campione ha una concentrazione ed una forza ionica molto minore del BGE, la sua conduttività è molto minore. In questa regione il campo elettrico sarà maggiore, portando ad un aumento della velocità elettroforetica e quindi ad un restringimento della zona del campione rispetto al tampone di supporto, e quindi a bande degli analiti più strette [32,37].

### ***Effetto Joule***

L'applicazione della differenza di potenziale all'elettrolita genera un passaggio di corrente con relativo innalzamento della temperatura, dovuto alla resistenza che la corrente incontra nel passare attraverso il tampone. L'entità dell'innalzamento dipende dalla potenza generata (prodotto di voltaggio e corrente) [35].

Con l'aumento della temperatura si ha una riduzione della viscosità e quindi un aumento della mobilità elettroforetica. Questo però non risulta costante su tutta la sezione del capillare, perché la parte di liquido direttamente a contatto con le pareti esterne tende a dissipare meglio il calore rispetto alle porzioni più interne. Le molecole poste al centro migrano quindi più velocemente di quelle più vicine alle pareti. Inoltre, nell'elettrolita si possono creare moti convettivi con conseguente rimescolamento delle zone separate. Per ridurre l'effetto Joule sono di grande aiuto capillari che presentano diametro minore e pareti più sottili e sistemi di raffreddamento efficienti. Tale effetto può essere ridotto anche diminuendo la conducibilità del BGE abbassandone la forza ionica; d'altronde bisogna tener conto che una riduzione della concentrazione dell'elettrolita può ridurre la sua capacità tamponante ed anche portare ad un aumento delle interazioni analita-parete. Alternativamente si possono usare BGE di bassa mobilità che contengono ioni con alto rapporto massa/carica [35].

### ***Sistemi di rivelazione***

Molti dei sistemi di rivelazione applicati all'elettroforesi capillare sono gli stessi che si usano per la cromatografia liquida, come ad esempio rilevatori UV e a fluorescenza, che sono anche i più comuni. In questo caso è necessaria una finestra di rilevazione sul capillare, che viene ottenuta asportando lo strato di poliimmide superficiale nella zona dove la luce emessa dal rivelatore incide sul capillare. La maniera più semplice per togliere il rivestimento consiste nel bruciare la parte interessata e poi rimuovere la poliimmide con un pezzetto di carta imbevuto di acetone, oppure nell'asportare meccanicamente lo strato di rivestimento [35].

Nei metodi a rivelazione indiretta ci si basa sulla scelta di un BGE con proprietà chimico-fisiche a cui il rivelatore risponde con un segnale di fondo relativamente elevato; le specie chimiche analizzate, raggiunto il rivelatore, diminuiscono la concentrazione del BGE a tale livello con conseguente diminuzione del segnale e ottenimento di un picco negativo. Tale metodo ad esempio è stato usato con rivelatore UV per ioni inorganici, amminoacidi non

derivatizzati e carboidrati. Qualsiasi ione che non possieda proprietà chimico-fisiche sfruttabili dai rivelatori a disposizione può essere rivelato con questo metodo senza grossi problemi; l'importante è selezionare correttamente i componenti del BGE. Con la rivelazione indiretta si può sfruttare la sensibilità molto elevata di alcuni rivelatori, come quello a fluorescenza ed elettrochimico. Infine la metodica analitica è molto semplice perché non è necessaria alcuna derivatizzazione [32].

Per quanto riguarda i metodi elettrochimici possono essere usati sistemi di rivelazione attraverso conducibilità e metodi amperometrici. Nella rivelazione attraverso conducibilità si misura la variazione di resistenza tra due elettrodi di platino posti l'uno di fronte all'altro all'interno del capillare [32]. La rivelazione amperometrica presenta una sensibilità molto elevata. L'analita è ossidato o ridotto alla superficie di un elettrodo a cui è applicato un potenziale costante; viene così generata una corrente proporzionale alla concentrazione dell'analita. La zona di rivelazione deve essere isolata dalla zona di separazione, principalmente perché la corrente applicata al capillare per eseguire l'analisi è di parecchi ordini di grandezza superiore a quella misurata col rivelatore [32].

Un altro metodo di rivelazione molto utilizzato è dato dall'accoppiamento dell'elettroforesi capillare ad uno spettrometro di massa. Questo permette di unire l'alta efficienza della CE alle capacità identificative della MS, e quindi di ottenere un sistema molto efficace per la separazione, identificazione e determinazione di miscele di analiti [32].

## **4.2. Applicazioni in analisi farmaceutica**

L'utilizzo dell'elettroforesi capillare in analisi farmaceutica è molto esteso e permette di risolvere efficacemente problematiche separative e quantitative [20-23,40]. Fino a pochi anni fa la tecnica più usata in questo campo era la HPLC. Attualmente l'uso della CE viene affiancato a quello dell'HPLC in modo da avere uno strumento complementare ed estremamente potente per la separazione e l'identificazione dei composti. La CE presenta infatti diversi vantaggi nei confronti della HPLC, quali ridottissimo consumo di costosi e tossici solventi organici, maggiore semplicità operativa e costi di gestione inferiori, non essendo necessario il mantenimento di una varietà di colonne specifiche [20,21,22,40].

L'ampia versatilità di questa tecnica è dimostrata dalle molteplici applicazioni riguardanti la determinazione di composti in miscela, quali ad esempio un farmaco e le sue

impurezze in forma farmaceutica o un farmaco e i suoi metaboliti nei fluidi biologici. Questo ed altri aspetti, concernenti il controllo di qualità di principi attivi sintetici o naturali, la risoluzione di farmaci chirali, lo studio della formazione del complesso farmaco-proteina o del complesso farmaco-ciclodestrina, sono solo alcuni dei temi di sicuro interesse farmaceutico che l'elettroforesi capillare contribuisce a risolvere [22].

In particolare la CE si dimostra particolarmente efficace nella separazione di composti chirali, dove presenta prestazioni superiori rispetto a GC e HPLC [41-43]. La separazione chirale e la determinazione della purezza enantiomerica di una sostanza sono temi di grande interesse in campo farmaceutico, dove spesso accade che l'efficacia o la tossicità di un composto chirale vari secondo l'enantiomero considerato. L'utilizzo di un selettore chirale da aggiungere al BGE è meno dispendioso rispetto alle colonne cromatografiche dedicate a questo tipo di analisi, inoltre la natura e concentrazione del selettore possono essere rapidamente modificate. L'elettroforesi capillare offre poi una maggiore robustezza rispetto all'HPLC, dove si può verificare instabilità della fase stazionaria con il selettore chirale [23]. I selettori chirali utilizzabili sono molteplici ed includono ciclodestrine naturali e modificate, sali biliari, carboidrati, eteri corona, complessi come Cu(II)-L-istidina, Cu(II)-aspartame, proteine (albumina di siero bovino,  $\alpha_1$ -glicoproteina acida), antibiotici (glicopeptidi, polipeptidi, ansamicine, aminoglicosidi) [22,39,43]. Possono anche essere utilizzati diversi selettori in combinazione [42].

Un'altra importante applicazione della CE è nei saggi analitici sulle forme farmaceutiche, sia per la determinazione del principio attivo che delle impurezze [24-30,89,90,96]. In questo campo apparentemente si osserva un deficit di prestazioni nei confronti dell'HPLC, dovuto soprattutto ad una minore ripetibilità delle analisi ed in particolare dell'area dei picchi, principalmente per una bassa ripetibilità nell'iniezione. Tuttavia questo problema viene facilmente risolto calcolando i tempi di migrazione e le aree dei picchi in riferimento a quelli di uno standard interno. La ripetibilità dei tempi può essere incrementata anche attraverso particolari procedure di lavaggio del capillare che permettono di rivestire le pareti con un tensioattivo carico che stabilizza il flusso elettroosmotico [22].

Altre applicazioni si hanno a livello di sviluppo di nuovi farmaci, dove è fondamentale individuare la farmacocinetica dei nuovi composti per stabilirne la biodisponibilità o la capacità di superare la barriera ematoencefalica e quindi per sviluppare la giusta formulazione. In questi casi la CE risulta particolarmente utile nella determinazione del Log P

e della  $pK_a$ . Ad esempio, con l'utilizzo di una tecnica MEKC è possibile mettere in relazione la mobilità elettroforetica con il Log P della molecola, oppure è possibile correlare la mobilità elettroforetica a diversi valori di pH risalendo alla  $pK_a$  della molecola analizzata [22].

### 4.3. Effetto di modificatori organici

L'aggiunta di solventi organici al BGE permette la separazione di alcuni composti non facilmente idrosolubili aumentando la loro solubilità nel tampone. Inoltre i solventi organici riducono il flusso elettroosmotico, portando ad una migliore risoluzione tra gli analiti, anche se a fronte di maggiori tempi di analisi [32].

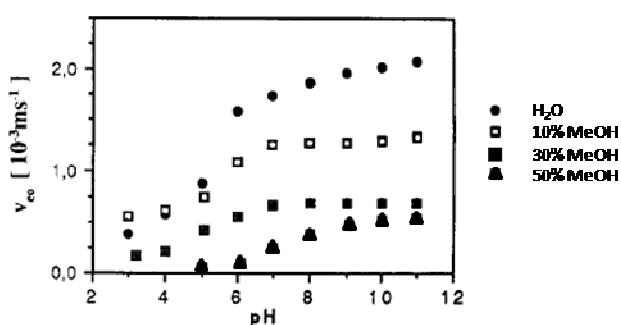


Fig. 4.5. Effetto dell'aggiunta di solvente organico (metanolo)

4.5.) [32,33]. Il primo effetto è una diminuzione della velocità elettroosmotica  $v_{eof}$  all'aumentare della concentrazione di solvente organico. Questo effetto aumenta ad alti valori di pH, dove tutti i gruppi silanologici del capillare dovrebbero essere dissociati ed è attribuibile

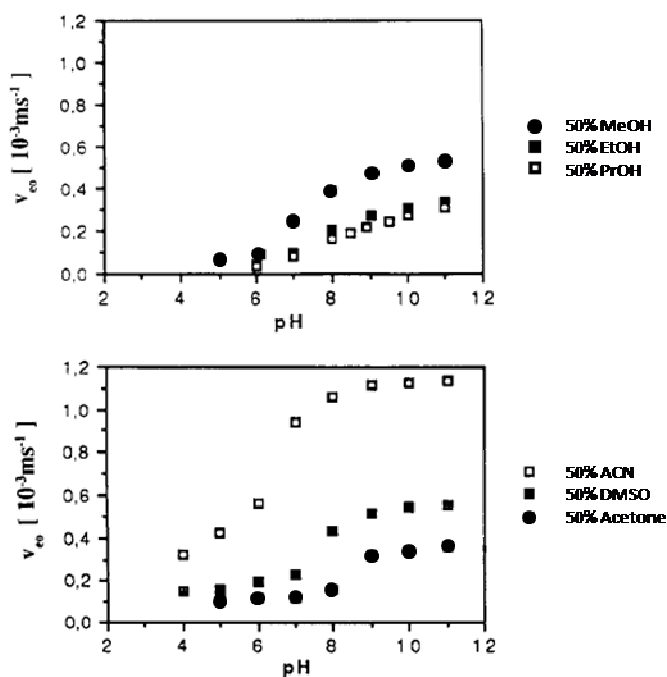


Fig. 4.6. Effetto dell'aggiunta di modificatori organici diversi

Quando additivi organici protici (metanolo MeOH, etanolo EtOH, 2-propanolo prOH) e aprotici dipolari (acetonitrile ACN, dimetilsolfossido DMSO e acetone) vengono impiegati come componenti del BGE, si possono osservare principalmente due effetti (fig.

all'aumento della viscosità e alla diminuzione della costante dielettrica dovute all'aggiunta del modificatore. Nel caso di alcoli  $v_{eof}$  diminuisce all'aumentare del numero di atomi di carbonio della catena (MeOH, EtOH, PrOH, butanolo) ed è maggiore per i glicoli [32,33]. Il secondo effetto è che aggiungendo solventi organici al BGE, il punto di flesso della curva  $v_{eof}/\text{pH}$  corrispondente alla  $pK'$  dei gruppi silanologici del capillare, si



sposta verso valori sempre più alti [33].

In fig. 4.6. vengono mostrati gli effetti su  $pK'$  di diversi solventi al 50% v/v [33].

DMSO influisce maggiormente sulla  $pK'$  dei gruppi silanologici, spostandone il valore di 3 unità, probabilmente a causa della sua scarsa capacità di solvatare gli anioni [32]. L'aggiunta di ACN ha un effetto molto inferiore, aumentando la  $pK'$  di una sola unità. Questo solvente agisce come un composto inerte in tamponi acquosi e non varia significativamente la viscosità del sistema. Permette quindi di ottenere una diminuzione di  $v_{eof}$  inferiore agli altri, fino a raggiungere al massimo 1/3 del valore ottenuto per l'H<sub>2</sub>O con una concentrazione di ACN dell'80% [33].

Altri modificatori impiegati sono ioni di alchilammonio come trietanolamina, trietilamina, poliamine, utilizzati come componenti cationici del tampone [31]. Questi composti, aggiunti a tamponi a pH fortemente acido, minimizzano l'adsorbimento aspecifico di analiti basici sulle pareti del capillare. Generano infatti un rivestimento dinamico della parete dando luogo ad uno strato caricato positivamente sulla superficie del capillare. Il flusso elettroosmotico viene invertito e la sua mobilità diminuita, apportando miglioramenti nella riproducibilità dei tempi di migrazione [31,52]. In particolare l'utilizzo di trietanolamina, agendo come contraione a bassa mobilità, ha portato alla separazione di analiti cationici con miglioramento nella simmetria dei picchi, basse correnti ed alti valori di efficienza [52].

#### ***4.3.1. Ottimizzazione multivariata e convalida di un metodo di elettroforesi capillare per la determinazione di resveratrolo in un prodotto nutraceutico [89].***

Il resveratrolo (RES, (E)-5-[2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl]-1,3-benzenediol) è una fitoalessina presente in vari tipi di piante tra cui alcune specie di *Arachis*, *Pinum*, *Polygonum*, *Veratrum*, e *Vitis*. Il resveratrolo possiede un'attività antiossidante che lo rende uno dei composti responsabili dell'azione cardioprotettiva del vino, sembra possedere attività antinfiammatorie, antiproliferative, ed è in studio per la prevenzione ed il trattamento di alcune forme tumorali. Per queste sue caratteristiche il resveratrolo è impiegato in integratori alimentari e in prodotti nutraceutici, preparazioni contenenti componenti di derivazione alimentare che apportano benefici in termini di salute.

In particolare questo studio si proponeva di ottimizzare, impiegando una strategia multivariata, un metodo di elettroforesi capillare rapido, semplice e selettivo per analizzare il RES estratto da *Polygonum cuspidatum* contenuto in compresse effervescenti di Resvis XR®

(Biofutura Pharma), ottenendo la completa separazione di tutti i componenti (principi attivi ed eccipienti) rilevabili alla lunghezza d'onda selezionata. Nella preparazione in esame sono associati al RES altri principi attivi come acido L-ascorbico (ASC), vitamina B<sub>2</sub> (sodium riboflavin 5'-monophosphate RIB), un estratto di arancio rosso contenente acidi idrossicinnamici (caffeico CAF, coumarico COU, ferulico FER, sinapico SIN) e flavanoni (esperidina HES, narirutina NAR), inoltre alla lunghezza d'onda selezionata (280 nm) era rilevabile l'eccipiente acesulfame K (ACE). Considerando anche lo standard interno acido flufenamico (FLU), la separazione coinvolgeva quindi un totale di 11 composti (fig. 4.7.).

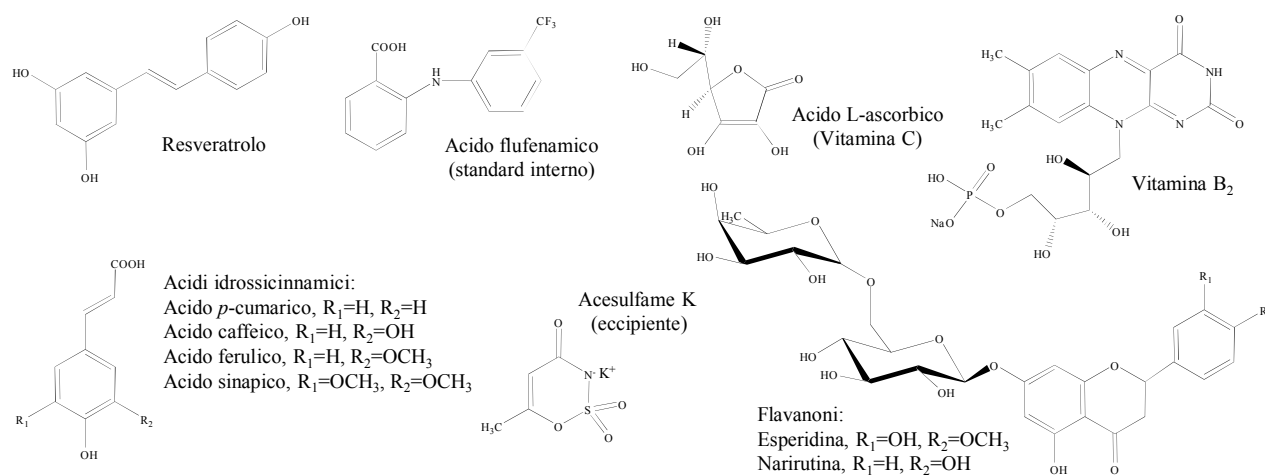


Fig. 4.7. Strutture molecolari degli analiti in esame.

A causa della natura fenolico/acida della maggior parte degli analiti, inizialmente è stato selezionato come BGE un sistema tampone borace 20 mM, esaminato in un range di pH 8.5-10.5, ad intervalli di 0.5 in condizioni standard (25 °C, 25 kV). Un effetto significativo sul numero di picchi risolti è stato evidenziato nel range di pH 9.5-10.5. Nonostante il piccolo intervallo considerato, sono state osservate inversioni nell'ordine di migrazione di acidi idrossicinnamici e acesulfame K. Risultati promettenti sono stati ottenuti a pH 10.0, valore che è stato fissato per le analisi seguenti, vista la necessità di avere un ordine di migrazione costante per applicare una strategia multivariata, dove è essenziale misurare univocamente le risposte di risoluzione tra i picchi. In queste condizioni l'ordine di migrazione degli analiti era il seguente: HES, NAR, RES, FLU, ASC, RIB, SIN, FER, ACE, COU, CAF. Tuttavia in queste condizioni non tutti i picchi erano completamente risolti, così per ottenere la completa separazione degli analiti in un ridotto tempo di analisi, si è reso necessario l'utilizzo di un modificatore organico. I migliori risultati sono stati ottenuti aggiungendo acetonitrile al BGE; la concentrazione di questo modificatore, insieme con la concentrazione del tampone ed il

voltaggio, sono stati studiati mediante la metodologia della superficie di risposta (RSM). Con la RSM infatti è possibile ottenere per ogni risposta un modello predittivo che rappresenti adeguatamente i cambiamenti della risposta all'interno della zona di interesse. In questo modo si può costruire una mappa (superficie) della risposta e prevedere la risposta considerata in tutto il range [6]. I fattori sono stati studiati nel seguente domino sperimentale:  $X_1$ , concentrazione del tampone borace, 7-23 mM;  $X_2$ , percentuale di acetonitrile, 0-16% v/v;  $X_3$ , voltaggio, 18-30 kV. Sono state considerate le risposte tempo di analisi  $t$  e le risoluzioni critiche  $R_1$  (tra HES e NAR),  $R_3$  (tra RES e FLU) e  $R_8$  (tra FER e ACE) (tab. 4.1.).

| Esp.<br>N. | BGE<br>conc. | %ACN<br>(v/v) | $V$<br>(kV) | $R_1$ | $R_3$ | $R_8$ | $t$<br>(min) |
|------------|--------------|---------------|-------------|-------|-------|-------|--------------|
| 1          | 10           | 3             | 20          | 1.04  | 3.95  | 1.21  | 8.68         |
| 2          | 20           | 3             | 20          | 1.36  | 1.03  | 2.14  | 8.02         |
| 3          | 10           | 13            | 20          | 1.02  | 1.96  | 0.87  | 7.18         |
| 4          | 20           | 13            | 20          | 1.45  | 2.98  | 2.26  | 10.17        |
| 5          | 10           | 3             | 28          | 0.70  | 2.86  | 1.15  | 4.04         |
| 6          | 20           | 3             | 28          | 1.23  | 0.82  | 2.57  | 5.18         |
| 7          | 10           | 13            | 28          | 1.23  | 1.87  | 0.54  | 4.75         |
| 8          | 20           | 13            | 28          | 1.51  | 3.00  | 4.04  | 6.52         |
| 9          | 7            | 8             | 24          | 0.99  | 0.01  | 0.01  | 4.58         |
| 10         | 23           | 8             | 24          | 1.54  | 2.47  | 4.26  | 7.84         |
| 11         | 15           | 0             | 24          | 1.07  | 1.91  | 0.01  | 5.25         |
| 12         | 15           | 16            | 24          | 1.40  | 0.78  | 2.47  | 7.62         |
| 13         | 15           | 8             | 18          | 1.38  | 0.01  | 1.36  | 8.63         |
| 14         | 15           | 8             | 30          | 1.00  | 0.77  | 1.05  | 4.72         |
| 15         | 15           | 8             | 24          | 1.45  | 0.54  | 0.89  | 6.41         |
| 16         | 15           | 8             | 24          | 1.19  | 0.01  | 1.37  | 5.94         |
| 17         | 15           | 8             | 24          | 1.24  | 0.23  | 0.91  | 6.32         |
| 18         | 15           | 8             | 24          | 1.14  | 0.01  | 1.43  | 5.90         |

Tab. 4.1. Piano sperimentale e risposte misurate.

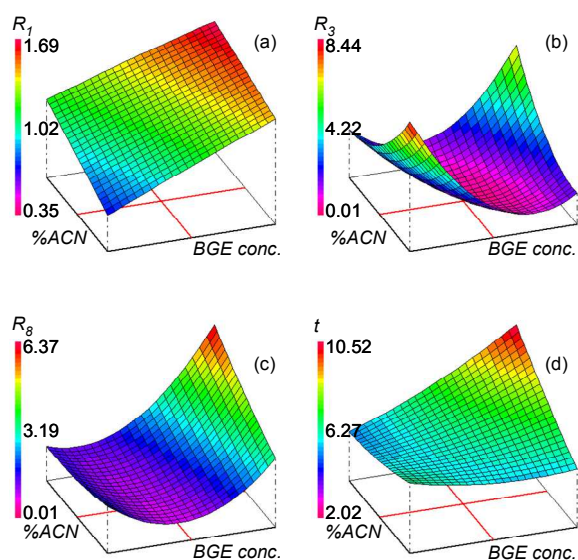


Fig. 4.8. Superfici di risposta: %ACN vs conc. BGE.

Tramite l'analisi della varianza (ANOVA) i modelli di regressione sono risultati essere validi e significativi. Per ottenere un compromesso tra le risposte che soddisfacesse i requisiti richiesti è stata introdotta la funzione di desiderabilità di *Derringer D*, in modo da convertire un problema multi-risposta in uno a risposta unica. Prima di prendere in considerazione la funzione di desiderabilità, è utile esaminare le singole superfici di risposta

che, pur non essendo state utilizzate direttamente per trovare le condizioni ottimizzate, hanno portato ad una migliore descrizione del sistema da un punto di vista strettamente elettroforetico.

In fig. 4.8 sono riportate le superfici di risposta ottenute in funzione di percentuale di acetonitrile e concentrazione del BGE, fissando il voltaggio al centro del dominio sperimentale. Per massimizzare  $R_f$  è necessario fissare entrambi i fattori ad alti livelli (a). Riguardo a  $R_3$  sono stati evidenziati per i due fattori effetti quadratici positivi ed inoltre è stata rilevata un'interazione positiva tra %ACN e concentrazione del BGE che porta ad una massimizzazione della risposta quando vengono fissati entrambi i fattori a bassi o ad alti livelli (b). Alti livelli dei due fattori massimizzano inoltre la risposta  $R_8$  (c), ma portano ad un aumento nei tempi di analisi (d).

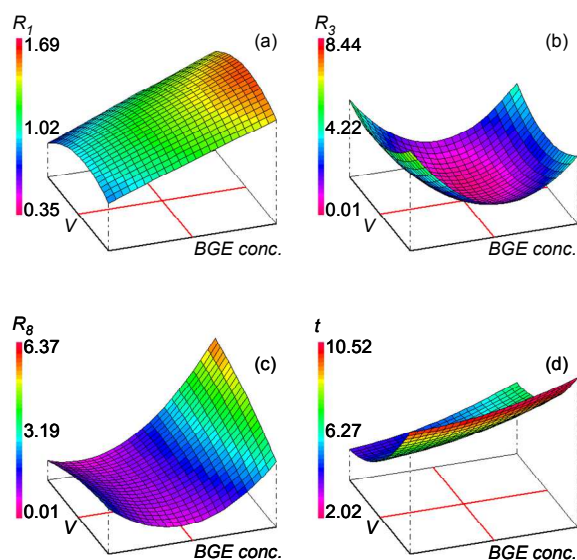


Fig. 4.9. Superfici di risposta: voltaggio vs conc. BGE.

In fig. 4.9 sono invece riportate le superfici di risposta in funzione di voltaggio e concentrazione del BGE, fissando %ACN al centro del dominio sperimentale. L'analisi di questi grafici mostra che il voltaggio non ha particolari effetti su  $R_f$  (a) e  $R_3$  (b) nel dominio sperimentale studiato, mentre alti livelli di voltaggio e concentrazione del BGE portano alla massimizzazione di  $R_8$  (c) e ad un aumento dei tempi di analisi (d).

Per risolvere questo problema è stata usata la funzione di desiderabilità di Derringer ( $D$ ) [6]. Si tratta di una strategia decisionale multicriterio, misura della qualità totale del fenomeno, che costituisce un adatto strumento per confrontare risposte diverse e per selezionare l'optimum con proprietà più desiderabili. Inizialmente vengono definite delle funzioni di desiderabilità parziali  $d_i$ , una per ogni risposta. Qualunque sia la funzione prescelta (lineare, a scalino, triangolare...) i valori di desiderabilità sono compresi tra zero, per valori della risposta ritenuti non accettabili, e uno, per la massima desiderabilità; in questo caso ulteriori miglioramenti non hanno importanza. In un secondo passaggio la qualità totale  $D$  è calcolata effettuando la media geometrica delle singole funzioni  $d_i$ :  $D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_m)^{1/m}$ . Inoltre, in dipendenza dell'importanza attribuita alla risposta, le funzioni individuali  $d_i$  possono essere pesate e di conseguenza la funzione di

desiderabilità totale  $D$  assume la forma  $D = (d_1^{w_1} x d_2^{w_2} x \dots x d_m^{w_m})^{1/(w_1+w_2+\dots+w_m)}$ . Viene poi applicato un algoritmo di calcolo alla funzione  $D$  in modo da determinare il set dei valori delle variabili che la massimizzano. Il valore di  $D$  è massimo dove la combinazione dei differenti criteri è globalmente ottimale.

In questo caso è stato definito un valore desiderato di risoluzione alla linea di base pari a 1.5 e un tempo massimo di 7 minuti, accettando parzialmente solo valori tra 7 e 8. All'interno del dominio sperimentale, è stata quindi calcolata la desiderabilità totale  $D = \sqrt[4]{d_1 d_2 d_3 d_4}$ , dove  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $d_3$  e  $d_4$  sono le funzioni di desiderabilità parziale relative rispettivamente alle risposte  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_8$  e  $t$ .

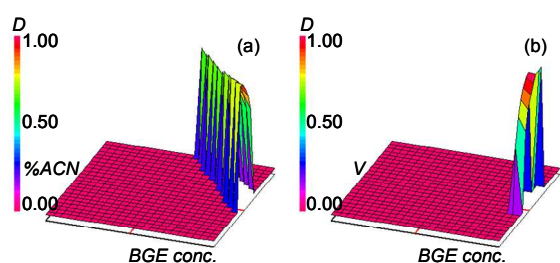


Fig. 4.10. Desiderabilità totale: rappresentazione tridimensionale

La zona in cui i requisiti erano soddisfatti era abbastanza ristretta e corrispondeva ad alti livelli di concentrazione di borace e a medio-alti valori di percentuale di acetonitrile e di voltaggio (fig. 4.10). Le condizioni sperimentali selezionate corrispondevano a:

$X_1$ , concentrazione di borace, 23 mM;  $X_2$ , percentuale di acetonitrile, 7% v/v;  $X_3$ , voltaggio, 26 kV. Applicando queste condizioni, una separazione completa degli analiti è stata ottenuta in meno di 7 min.

Il relativo elettroferogramma è riportato in fig. 4.11. I valori sperimentali erano compresi all'interno dei limiti di confidenza, così è stata verificata una buona corrispondenza tra risposte predette ed osservate.

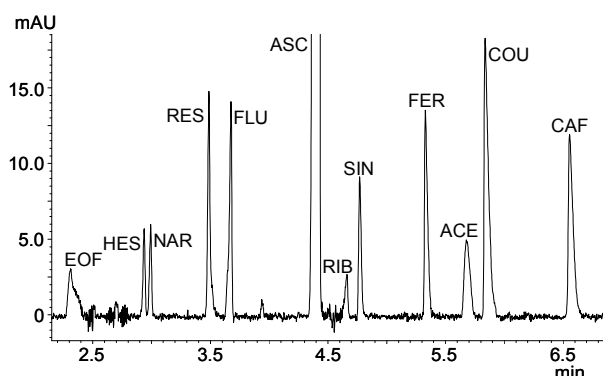


Fig. 4.11. Elettroferogramma corrispondente alle condizioni ottimizzate.

Il metodo ottimizzato è stato quindi convalidato secondo le linee guida ICH [94]. Sono stati valutati i parametri selettività, robustezza, ripetibilità del tempo di migrazione e delle aree corrette, linearità e range di linearità, accuratezza e precisione e *system suitability*.

In particolare per il test di robustezza è stato applicato il disegno sperimentale mediante una matrice di Plackett-Burman a otto esperimenti per 6 fattori testati all'interno del dominio: conc. BGE, 22-24 mM; pH, 9.9-10.1; percentuale di acetonitrile, 6-8% v/v; temperatura, 24-26 °C; voltaggio, 25-27 kV. Per

valutare l'effetto dei fattori sulla selettività sono state prese in considerazione le risposte  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_8$ .

Per identificare i fattori critici è stata effettuata l'analisi grafica degli effetti (fig. 4.12.). Ogni barra colorata corrisponde ad un effetto e la lunghezza della barra è proporzionale al valore assoluto dell'effetto. Gli effetti significativi sono quelli che superano le linee di delimitazione calcolate in base alla varianza sperimentale.

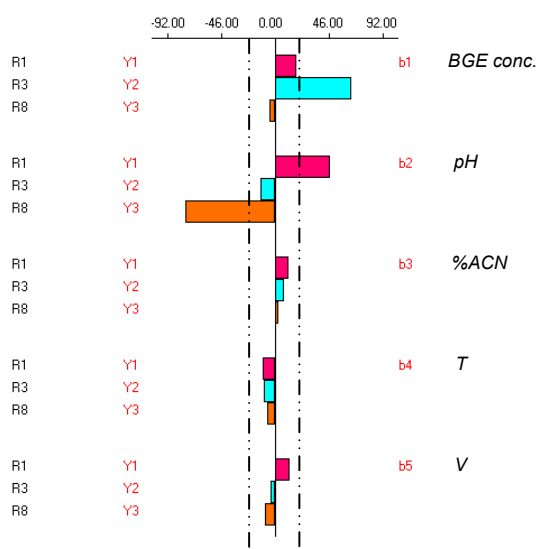


Fig. 4.12. Test di robustezza: analisi grafica degli effetti.

Si può notare che la risposta  $R_3$  è significativamente dipendente dalla concentrazione del BGE, mentre  $R_1$  e  $R_8$  sono influenzate dal pH. In particolare l'effetto maggiore è quello su  $R_8$ , cosa che era già stata sottolineata nella fase di ottimizzazione, quando era stato deciso di fissare il valore di pH prima di procedere con lo studio della superficie di risposta. I risultati hanno quindi evidenziato che per mantenere una buona selettività bisogna porre particolare attenzione alla preparazione del BGE, specialmente per quanto riguarda il controllo del pH.

Le condizioni ottimizzate sono state quindi applicate con successo alla determinazione del reveratrololo in compresse effervescenti di Resvis XR<sup>®</sup>, contenenti 2.5 mg di RES. Il contenuto era in accordo con il dichiarato: recovery,  $102.6 \pm 2.5$ ; RSD, 1.5%;  $n=4$ ;  $\alpha/2=0.025$ .

Con alcuni accorgimenti pratici, il metodo sviluppato può essere esteso alla determinazione degli altri principi attivi contenuti nelle compresse. In questo caso è necessario selezionare un'adeguata concentrazione test per i differenti composti, tenendo in considerazione contemporaneamente la necessità di ottenere un segnale per l'analita tale da poter essere utilizzato ai fini quantitativi e di mantenere una buona risoluzione tra i picchi adiacenti.

#### 4.4. Aggiunta di ciclodestrine

In elettroforesi capillare l'uso di un BGE contenente una ciclodestrina o una miscela di ciclodestrine è molto frequente.

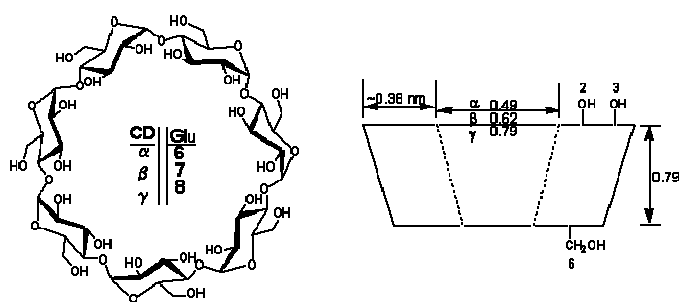


Fig. 4.13. Struttura delle ciclodestrine native ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ).

Le ciclodestrine (CD) sono oligosaccaridi ciclici costituiti da catene di 6, 7 o 8 molecole di D-(+)-glucosio con legami  $\alpha$ -(1-4), definite rispettivamente  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ - ciclodestrine. Non possiedono gruppi riducenti [44] e sono caratterizzate da una forma

troncoconica, l'interno della quale è altamente lipofilo mentre la superficie esterna ha caratteristiche idrofile (fig. 4.13) [42]. Ogni singolo monomero possiede cinque atomi di carbonio asimmetrici e questo conferisce a tutto il polisaccaride proprietà ottiche, che possono essere modulate grazie alla derivatizzazione sui carboni in posizione 2, 3 e 6 [42]. La possibilità di derivatizzazione dei composti nativi ha portato ad ottenere un gran numero di ciclodestrine che possono presentare carica netta nulla, positiva o negativa [42]. I derivati alchilici e idrossialchilici mostrano migliore solubilità delle ciclodestrine native e sono relativamente economici. Tra le ciclodestrine ionizzabili le più frequenti sono i derivati anionici come solfati, solfoalchilici, carbossialchilici, fosfati. Tuttavia vengono usati anche derivati cationici come le ciclodestrine amino sostituite [42].

Le ciclodestrine neutre sono principalmente utilizzate per separare soluti con una carica netta. La formazione del complesso soluto/ciclodestrina porta ad una variazione della mobilità elettroforetica del soluto complessato rispetto al soluto libero e ciò permette di separare gli analiti sulla base della loro diversa affinità per le ciclodestrine. La mobilità media apparente di un soluto ( $\mu_{app}$ ) può essere correlata alla mobilità intrinseca del soluto ( $\mu_{\Lambda}$ ) e del complesso di inclusione soluto-ciclodestrina ( $\mu_{\Lambda CD}$ ), come  $\mu_{app} = \frac{\mu_{\Lambda} + \mu_{\Lambda CD} K[CD]}{1 + K[CD]}$  [44,45].

Quindi, la qualità della risoluzione dipende della concentrazione della ciclodestrina nell'elettrolita e la selettività dipende dal fatto che si formi un complesso più o meno stabile con la ciclodestrina [44,45].

Una delle applicazioni principali delle ciclodestrine neutre è la separazione di proteine e peptidi a lunga catena. Generalmente la separazione di questo tipo di composti risulta difficoltosa perché il rapporto carica/massa degli analiti è molto simile e le minime differenze strutturali tra una proteina e l'altra non permettono di ottenere mobilità elettroforetiche

sufficientemente diverse per la separazione. Viceversa, con l'aggiunta di opportune concentrazioni di ciclodestrine al BGE è possibile ottenere una buona risoluzione [44].

In campo farmaceutico le ciclodestrine vengono utilizzate con successo per separare e quantificare principi attivi in matrici biologiche e per determinare i principi attivi e le loro impurezze all'interno delle forme farmaceutiche. Questi oligosaccaridi sono infatti capaci di differenziare gli isomeri posizionali di alcuni composti aromatici, principalmente strutture in cui sono presenti anelli benzenici o naftaleni [44,90].

Altri tipi di applicazione trovano le ciclodestrine cariche negativamente, che si comportano come una specie di micelle che migrano con una velocità inferiore rispetto al resto del tampone allargando così la finestra di separazione. Concettualmente queste costituiscono una fase pseudostazionaria simile a quella che si ottiene nella MEKC. In questo caso le prestazioni sono particolarmente sensibili sia alla concentrazione delle ciclodestrine che alle variazioni di pH, che modifica la velocità di EOF e quindi la dimensione della finestra di separazione [44]. La presenza di una carica sulla ciclodestrina permette la separazione di miscele contenenti sia composti neutri che carichi. Il principale svantaggio che limita l'applicazione delle ciclodestrine anioniche è il fatto che usandone elevate concentrazioni si sviluppano elevati livelli di corrente e occorrono tempi di analisi molto lunghi [44].

L'utilizzo delle ciclodestrine risulta particolarmente utile per le analisi ambientali di ricerca di contaminanti tossici, spesso presenti in miscele complesse di composti molto simili in basse concentrazioni. Molti dei contaminanti ambientali sono caratterizzati da strutture neutre e insolubili in acqua, come i policloro bifenili, le policloro diossine e gli idrocarburi policiclici aromatici. Particolare attenzione è stata rivolta verso questa ultima classe di contaminanti, principalmente per la loro cancerogenicità, quindi è stata sviluppata una serie di metodi per la loro determinazione [46-49]. Tra questi metodi quello che dà le migliori prestazioni [49] consiste nell'utilizzare due  $\beta$ -ciclodestrine, una anionica ed una neutra, così che i soluti sono separati in base alla loro differente affinità per la ciclodestrina neutra, che migra insieme al flusso elettroosmotico, e quella per la ciclodestrina carica, che risulta rallentata dall'attrazione verso l'anodo. Le coppie di ciclodestrine principalmente utilizzate sono due: solfobutil- $\beta$ -CD/metil- $\beta$ -CD e carbossimetil- $\beta$ -CD/idrossipropil- $\beta$ -CD. L'utilizzo della prima coppia porta a migliori risultati per quanto riguarda la risoluzione, l'efficienza e la velocità di analisi [44].



Attualmente le ciclodestrine costituiscono il gruppo più importante di selettori chirali per elettroforesi capillare [43]. Questo principalmente per il loro alto potere risolutivo e per la variabilità e disponibilità di ciclodestrine presenti sul mercato. Il meccanismo più ampiamente accettato per l'enantiorisoluzione con una ciclodestrina consiste nell'inclusione dell'analita chirale nella cavità e nello stabilirsi di un'interazione secondaria con i gruppi ossidrilici sul bordo della ciclodestrina [42]. Queste interazioni differiscono tra gli enantiomeri e sono responsabili delle differenze nelle costanti di inclusione  $K_1$  e  $K_2$ . L'inclusione del soluto nella cavità è una condizione necessaria ma non sufficiente per l'enantiorisoluzione, per cui la dimensione e la forma del selettore e del selettando devono essere attentamente controllate. L'enantioseparazione è possibile anche se i due enantiomeri hanno la stessa costante di legame con il selettore, se i due complessi diastereomerici hanno diversa mobilità [43,50]

I risultati migliori di enantiorisoluzione vengono ottenuti con ciclodestrine modificate. Sostituendo gruppi ossidrilici con gruppi alchilici si aumenta la solubilità e la flessibilità della ciclodestrina; questi due fattori facilitano l'adattamento del soluto ed aumentano la stabilità del complesso risultante come pure le capacità di enantiorisoluzione [51].

In generale le ciclodestrine cariche offrono un potere risolutivo maggiore rispetto a quelle neutre grazie alle possibili interazioni elettrostatiche con enantiomeri di segno opposto. Tenendo sotto particolare controllo il flusso elettroosmotico è possibile anche separare sostanze cariche di segno uguale a quello del selettore. Data la natura principalmente basica delle molecole con attività biologica lo sviluppo di nuove ciclodestrine e il loro utilizzo è sbilanciato a favore di quelle anioniche. Le ciclodestrine cationiche vengono principalmente utilizzate per la separazione di molecole che presentano gruppi acidi, e il loro utilizzo richiede il rivestimento del capillare con poliacrilamide per evitare che la carica della ciclodestrine si leghi in maniera stabile ai gruppi silanologici del capillare [42].

#### ***4.4.1. Sviluppo di un metodo elettroforetico capillare per la determinazione di mizolastina e delle sue impurezze in forme farmaceutiche mediante la metodologia della superficie di risposta [90].***

Obiettivo di questo lavoro è stato lo sviluppo di un metodo elettroforetico capillare per la determinazione della mizolastina e di 7 sue impurezze, che risultasse applicabile nell'analisi di routine nel controllo di qualità della forma farmaceutica. Le prestazioni richieste al metodo erano separazione completa degli analiti, breve tempo di analisi e limiti di quantificazione per

le impurezze pari allo 0.1% p/p rispetto al componente principale. Sia in fase di ottimizzazione che di convalida sono state utilizzate strategie multivariate.

La mizolastina (MIZO, 2-(1-[1-(4-Fluoro-benzyl)-1*H*-benzimidazol-2-yl]-piperidin-4-yl)-methyl-amino)-3*H*-pyrimidin-4-one), è un farmaco antiistaminico di seconda generazione a carattere basico di cui sono note sette principali impurezze, anch'esse di natura basica (I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, I<sub>3</sub>, I<sub>4</sub>, I<sub>5</sub>, I<sub>6</sub>, I<sub>7</sub>) (fig. 4.14).

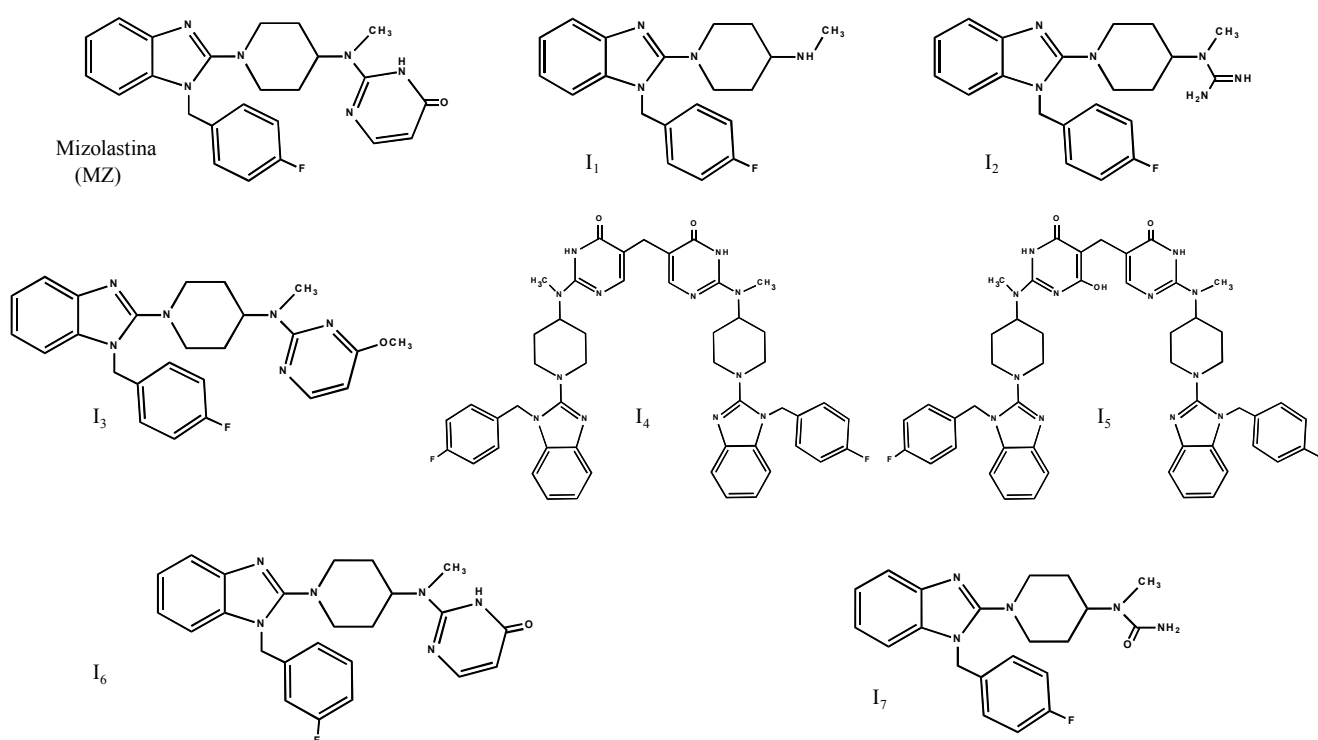


Fig. 4.14. Strutture molecolari degli analiti: mizolastina e impurezze correlate.

In teoria composti di questo tipo potrebbero essere separati in CZE semplicemente sfruttando la loro diversa mobilità elettroforetica scegliendo un opportuno pH acido. Tuttavia, in questo caso l'analisi delle impurezze costituiva una sfida alla selettività della tecnica perché gli analiti presentavano rapporti carica/massa, e quindi le relative mobilità elettroforetiche, molto simili. Esperimenti preliminari hanno infatti indicato come risultasse difficile ottenere la separazione richiesta utilizzando come *background electrolyte* un semplice tampone senza additivi. Sono stati quindi valutati diversi possibili metodi per migliorare la selettività: l'aggiunta di solventi organici, che influenzano le proprietà acido-base degli analiti, e l'utilizzo di una fase pseudostazionaria a base di tensioattivi neutri e/o zwitterionici, che inseriscono tra i meccanismi di separazione anche la ripartizione tra fase acquosa e fase

micellare. Nella prima fase dello studio sono stati aggiunti al tampone di corsa diversi modificatori organici, con diverse caratteristiche di polarità e viscosità. Mantenendo come elettrolita di base un tampone fosfato/NaOH 100 mM pH 3.5 e utilizzando condizioni standard pari a 18 °C e 15 kV, è stato valutato l'effetto di diversi solventi al 20% v/v: dimetilformammide, metanolo, etanolo, isopropanolo e acetonitrile.

Dagli elettroferogrammi ottenuti si poteva osservare una notevole variabilità nella selettività, sia come numero di picchi (6 o 7) sia come ordine di migrazione dei picchi stessi. Inoltre con nessuno dei solventi testati veniva raggiunta la risoluzione degli otto picchi (fig. 4.15).

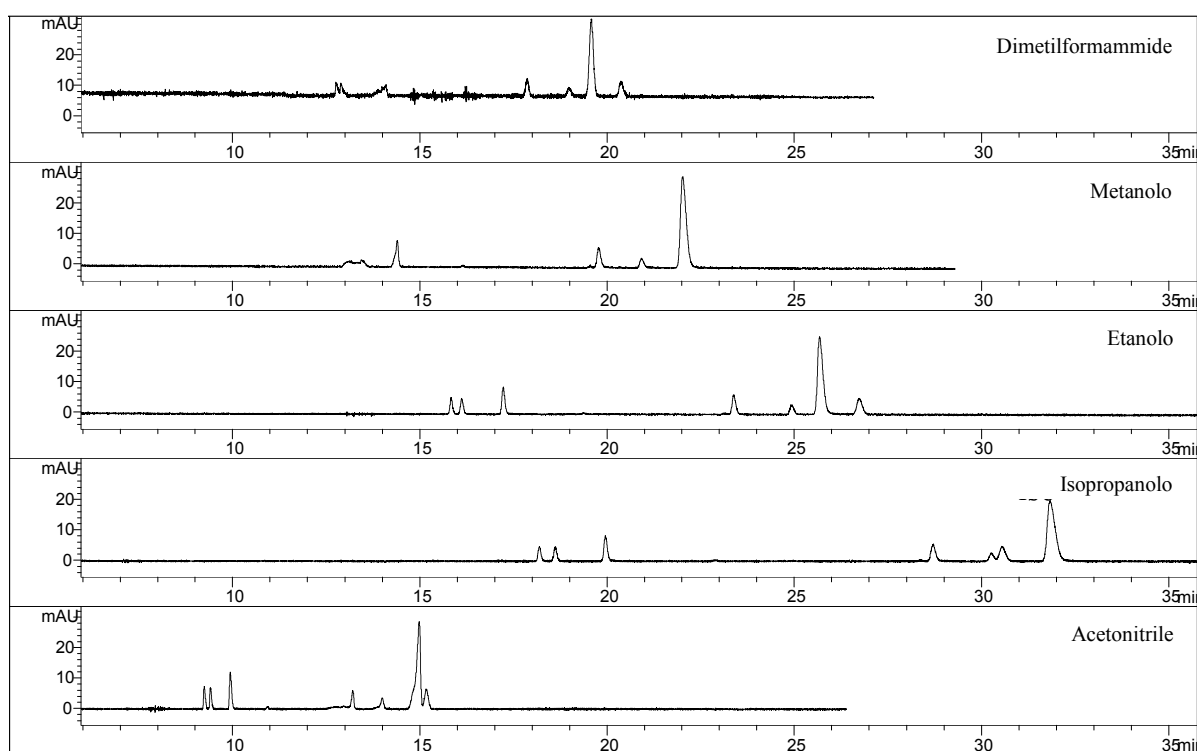


Fig. 4.15. Effetto dell'aggiunta al BGE di diversi solventi organici al 20% v/v.

I migliori risultati sono stati comunque ottenuti nel caso dell'aggiunta di acetonitrile, dove appariva la separazione di sette picchi in un tempo di analisi relativamente breve.

Quindi, dopo aver scelto l'acetonitrile come modificatore organico, è stato effettuato uno studio di screening prendendo in considerazione diverse variabili che potevano influenzare l'analisi: temperatura, voltaggio, concentrazione di tampone, pH e concentrazione di acetonitrile. Le risposte considerate erano le risoluzioni tra i picchi e il tempo di analisi. È stato ipotizzato un modello lineare che correlasse i fattori alla risposta ed è stata utilizzata una matrice di Hadamard per stimarne i coefficienti. Tuttavia in nessuna analisi apparivano otto

picchi, sia pure parzialmente separati. Inoltre, il problema principale era costituito dal fatto che gli elettroferogrammi ottenuti non permettevano di trattare sistematicamente le risposte relative alle risoluzioni. Infatti in diversi casi si osservava un'inversione nell'ordine di migrazione degli analiti, rendendo impossibile la misura univoca della relativa risoluzione.

Quindi, dato che la selettività di un metodo CZE con additivi organici era insufficiente, e che soprattutto non apparivano significativi margini di miglioramento, è stato deciso di abbandonare questa modalità operativa.

Sono stati ottenuti invece risultati promettenti utilizzando come tampone un sistema fosfato/trietanolamina 100 mM a pH 3.0 con aggiunta di una opportuna ciclodestrina. In queste condizioni la necessaria selettività si otteneva dall'azione combinata dell'inversione del flusso elettroosmotico dovuta alla trietanolamina e della diversa capacità complessante della ciclodestrina nei confronti degli analiti.

È stato eseguito uno screening iniziale per valutare quale ciclodestrina fornisse i migliori risultati. Le analisi sono state eseguite alla temperatura di 30° C, applicando un voltaggio di 18 kV ed utilizzando come elettrolita il tampone fosfato 100 mM titolato a pH 3 con trietanolamina (TEA). Sono state prese in considerazione diverse ciclodestrine neutre, alchiliche e idrossialchiliche: (2-idrossipropil)- $\alpha$ -CD, (2-idrossipropil)- $\beta$ -CD, (2-idrossipropil)- $\gamma$ -CD, metil- $\beta$ -CD, (2,6-di-O-metil)- $\beta$ -CD e (2,3,6-tri-metil)- $\beta$ -CD. È stato valutato anche l'utilizzo della ciclodestrina anionica (2-carbossietil)- $\beta$ -CD, sia da sola che in combinazione con la (2-idrossipropil)- $\beta$ -CD. I risultati migliori in quanto a selettività e tempo di analisi sono stati ottenuti con la (2,3,6-tri-metil)- $\beta$ -CD (TM $\beta$ CD) (fig. 4.16).

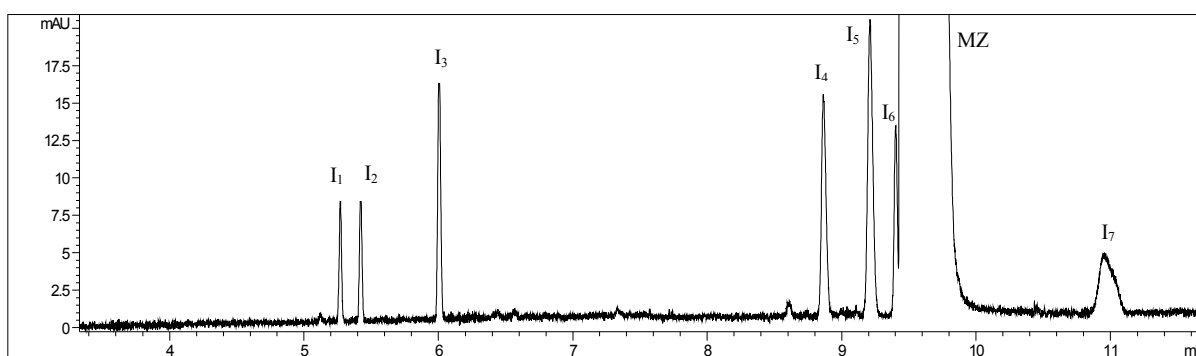


Fig. 4.16. Tampone fosfato/TEA 100 mM pH=3, TM $\beta$ CD 20 mM, 30°C, 18kV.

In queste condizioni, la procaina cloridrato (PR) è stata scelta come standard interno per i fini quantitativi. La separazione coinvolgeva quindi nove composti che migravano nell'ordine: I1, I2, I3, PR, I4, I5, I6, MZ, I7.

Per ottimizzare le condizioni di analisi è stata applicata la metodologia della superficie di risposta (*Response Surface Methodology, RSM*) [6] che consente di ottenere una mappa che rappresenti fedelmente il fenomeno nel dominio sperimentale in studio.

In questo caso i fattori da considerare erano concentrazione della TM $\beta$ CD, concentrazione del tampone fosfato, temperatura e voltaggio. Il pH non è stato incluso tra i fattori considerati perché effettuando un set di esperimenti preliminari univariati nel range di valori 2.5-3.5 la selettività variava fortemente anche in seguito a piccoli cambiamenti di pH. È stato quindi deciso di fissare il pH a 3.0, un valore la cui utilità era stata già riscontrata in letteratura [31]. Questa scelta è stata supportata sia dal fatto che l'inversione di EOF è fortemente dipendente dal valore del pH, sia dal fatto che è stato precedentemente dimostrato che i migliori risultati per quanto riguarda l'efficienza e la simmetria dei picchi relativi a soluti basici si ottengono generalmente lavorando a pH 3.0. Probabilmente, infatti, in queste condizioni si riduce la possibilità che gli analiti cationici interagiscano con le cariche negative delle pareti del capillare.

I quattro fattori considerati sono stati studiati mediante il piano sperimentale riportato in tab. 4.2. Il voltaggio è stato studiato a tre livelli, la concentrazione di ciclodestrina a cinque livelli, mentre gli altri due fattori sono stati studiati a sette livelli. Il dominio sperimentale per le quattro variabili è stato così selezionato:  $X_1$ , concentrazione TM $\beta$ CD, 8-12 mM;  $X_2$ , concentrazione BGE, 80-150 mM;  $X_3$ , temperatura, 16-24 °C;  $X_4$ , voltaggio, 24-30 kV.

I limiti del dominio sperimentale sono stati stabiliti grazie alle conoscenze acquisite da esperimenti preliminari. Per quanto riguarda la concentrazione della ciclodestrina, è stato evidenziato che a valori superiori a 12 mM si verificava un'inversione tra i picchi  $I_5$  e  $I_6$ , rendendo difficile trattare statisticamente la risoluzione tra queste due impurezze. D'altra parte, concentrazioni inferiori a 8 mM influivano negativamente sulle risoluzioni tra i picchi  $I_1/I_2$  e  $I_6/MZ$ . Per quanto concerne la concentrazione del tampone fosfato, sono state scelte concentrazioni piuttosto alte per mantenere un effetto *stacking*. Nonostante l'alta forza ionica del tampone, l'uso della trietanolamina ha permesso di mantenere comunque bassi i valori della corrente generata.

Le risposte considerate sono state le risoluzioni critiche tra i picchi  $I_1/I_2$  ( $R_1$ ),  $I_5/I_6$  ( $R_6$ ) e  $I_6/MZ$  ( $R_7$ ), da massimizzare, e il tempo di analisi  $t$ , misurato come tempo di migrazione dell'ultimo picco  $I_7$ , da minimizzare.

Il disegno di Doehlert ha permesso di costruire la superficie di risposta stimando i coefficienti di un modello polinomiale di secondo ordine. Il numero di esperimenti era pari a 24 ( $k^2+k+4$ , dove  $k$  è il numero di fattori), inclusi quattro esperimenti al centro del dominio per determinare la varianza sperimentale (tab. 4.2).

| No. esp. | CD conc.<br>(mM) | BGE conc.<br>(mM) | T<br>(°C) | V<br>(kV) | R <sub>1</sub> | R <sub>6</sub> | R <sub>7</sub> | t<br>(min) |
|----------|------------------|-------------------|-----------|-----------|----------------|----------------|----------------|------------|
| 1        | 12               | 115               | 20        | 27        | 1.71           | 1.15           | 1.20           | 11.10      |
| 2        | 8                | 115               | 20        | 27        | 1.18           | 4.34           | 0.85           | 10.49      |
| 3        | 11               | 150               | 20        | 27        | 0.84           | 0.89           | 1.20           | 11.35      |
| 4        | 9                | 80                | 20        | 27        | 2.98           | 7.84           | 0.81           | 10.66      |
| 5        | 11               | 80                | 20        | 27        | 2.99           | 5.14           | 0.83           | 10.33      |
| 6        | 9                | 150               | 20        | 27        | 0.01           | 0.01           | 1.39           | 12.03      |
| 7        | 11               | 127               | 24        | 27        | 1.56           | 0.01           | 1.27           | 10.18      |
| 8        | 9                | 103               | 16        | 27        | 2.21           | 4.75           | 0.85           | 11.87      |
| 9        | 11               | 103               | 16        | 27        | 2.39           | 4.02           | 0.96           | 12.06      |
| 10       | 10               | 138               | 16        | 27        | 1.29           | 1.67           | 1.54           | 13.10      |
| 11       | 9                | 127               | 24        | 27        | 1.34           | 1.48           | 1.08           | 9.80       |
| 12       | 10               | 92                | 24        | 27        | 2.46           | 3.31           | 0.86           | 9.63       |
| 13       | 11               | 127               | 21        | 30        | 1.38           | 0.01           | 1.52           | 9.04       |
| 14       | 9                | 103               | 19        | 24        | 2.02           | 5.00           | 0.84           | 13.33      |
| 15       | 11               | 103               | 19        | 24        | 2.46           | 2.31           | 1.06           | 14.11      |
| 16       | 10               | 138               | 19        | 24        | 1.28           | 0.67           | 1.30           | 15.09      |
| 17       | 10               | 115               | 23        | 24        | 1.80           | 0.01           | 1.05           | 12.36      |
| 18       | 9                | 127               | 21        | 30        | 0.01           | 1.87           | 1.06           | 8.58       |
| 19       | 10               | 92                | 21        | 30        | 2.34           | 3.88           | 0.92           | 8.66       |
| 20       | 10               | 115               | 17        | 30        | 1.72           | 2.23           | 0.99           | 9.85       |
| 21       | 10               | 115               | 20        | 27        | 1.66           | 1.99           | 1.10           | 11.12      |
| 22       | 10               | 115               | 20        | 27        | 1.80           | 2.56           | 0.98           | 10.81      |
| 23       | 10               | 115               | 20        | 27        | 1.76           | 2.10           | 1.03           | 11.18      |
| 24       | 10               | 115               | 20        | 27        | 1.55           | 2.68           | 1.09           | 11.03      |

Tab. 4.2. Piano sperimentale e risposte misurate.

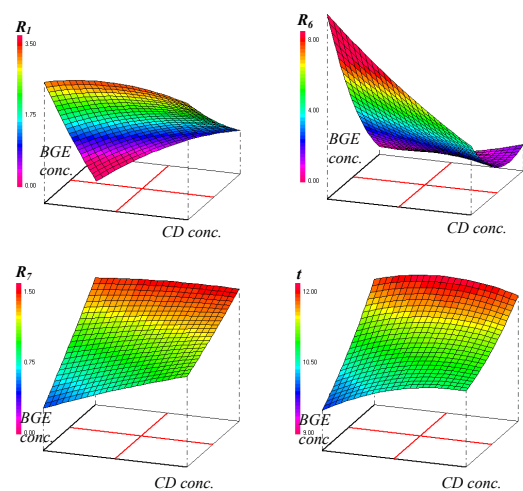


Fig. 4.17. Superfici di risposta concentrazione di ciclodestrina vs concentrazione BGE.

Le risposte ottenute sono state trattate statisticamente e l'analisi della varianza (ANOVA), sotto riportata, ha indicato che il modello di regressione calcolato era valido e significativo per ognuna delle risposte considerate. I modelli ottenuti sono stati rappresentati graficamente tramite le superfici di risposta. Le superfici riportate in fig. 4.17 sono state ottenute riportando in grafico i valori di risoluzione  $R_1$ ,  $R_6$  e  $R_7$  e i valori del tempo di analisi in funzione

della concentrazione della ciclodestrina (*CD conc.*) e della concentrazione del BGE (*BGE conc.*). Osservando queste superfici di risposta si nota che per massimizzare  $R_1$  era necessario utilizzare un livello intermedio di concentrazione di ciclodestrina e basse concentrazioni di BGE. Invece, per incrementare  $R_6$  era necessario mantenere un livello basso per entrambi i fattori, per cui è stata rilevata una interazione positiva. Su questa stessa risoluzione è stato anche evidenziato un effetto quadratico della concentrazione di BGE. Livelli bassi in questi due fattori consentivano anche di ridurre il tempo d'analisi, mentre per ottimizzare  $R_7$  ambedue i fattori devono essere fissati ad un livello alto.

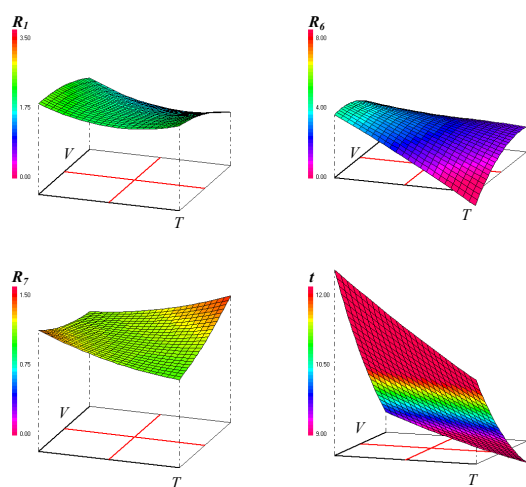


Fig. 4.18. Superfici di risposta voltaggio vs temperatura.

In fig. 4.18 sono riportate le superfici di risposta ottenute in funzione della temperatura e del voltaggio. Da queste superfici è possibile dedurre che il voltaggio aveva un effetto negativo su  $R_1$  e sul tempo di analisi, mentre la temperatura esercitava un effetto negativo su  $R_6$  e sul tempo di analisi. Per quanto riguarda  $R_6$ , è stato evidenziato anche un effetto quadratico del voltaggio.

Dall'analisi di questi risultati si è concluso che per ottenere le migliori prestazioni dal metodo era necessario individuare i valori dei fattori che portavano al compromesso ottimale tra le diverse risposte. Per risolvere questo problema è stata usata anche in questo caso la funzione di desiderabilità di Derringer ( $D$ ).

A tutte le risposte considerate è stato assegnato lo stesso peso e sono state calcolate le funzioni di desiderabilità parziale  $d_i$  e la funzione  $D$ . Definendo quindi le funzioni di desiderabilità parziali  $d_1$  per  $R_1$ ,  $d_2$  per  $R_6$ ,  $d_3$  per  $R_7$  e  $d_4$  per  $t$ , la funzione  $D$  ha assunto la forma  $D = \sqrt[4]{d_1 d_2 d_3 d_4}$ .

Il primo requisito richiesto è stato la risoluzione alla linea di base di tutti i picchi, e per  $R_1$  e  $R_6$  è stato fissato un valore minimo di 1.5. Per  $R_7$ , calcolata con il metodo statistico, è stato invece stabilito un valore desiderato pari a 0.9, che sulla base degli elettroferogrammi ottenuti nel disegno di Doehlert era sufficiente per la separazione alla linea di base di  $I_6$  e MZ. Il secondo requisito è stato la velocità dell'analisi, quindi la funzione di desiderabilità parziale per il tempo di analisi è stata definita accettando valori inferiori a 13 minuti e ritenendo ottimali valori inferiori a 12 minuti.

La funzione di desiderabilità totale  $D$  è stata quindi rappresentata graficamente (fig. 4.19). Dall'analisi della sua rappresentazione bidimensionale in funzione della concentrazione di ciclodestrina e di tampone si osserva come vi fosse un range piuttosto limitato di valori per questi due fattori che portava alla massima desiderabilità. Invece, un numero molto più ampio

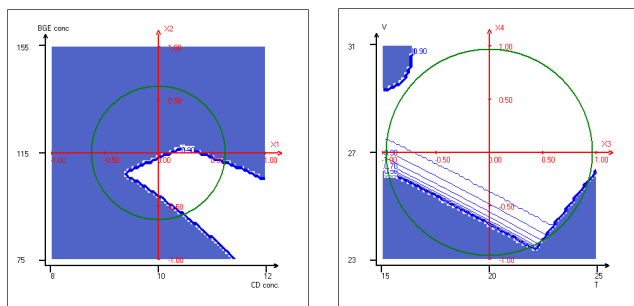


Fig. 4.19. Funzione di desiderabilità: rappresentazioni bidimensionali

di combinazioni di valori per la temperatura ed il voltaggio permettevano di raggiungere le prestazioni di analisi desiderate.

Attraverso la funzione di desiderabilità totale sono state scelte le seguenti condizioni ottimizzate:

*concentrazione del BGE, 105 mM; concentrazione di TM $\beta$ CD, 10 mM; temperatura, 19 °C; voltaggio, 30 kV.* In fig. 4.20 è riportato l'elettroferogramma ottenuto applicando le condizioni ottimizzate e con un campione di concentrazioni: MZ, 2 mg/mL; I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, I<sub>3</sub>, I<sub>4</sub>, I<sub>5</sub>, I<sub>6</sub>, I<sub>7</sub>, 20  $\mu$ g/mL; PR, 0.5 mg/mL. La completa risoluzione tra gli analiti veniva ottenuta in un tempo inferiore ai dieci minuti con una corrente generata di circa 65-70  $\mu$ A.

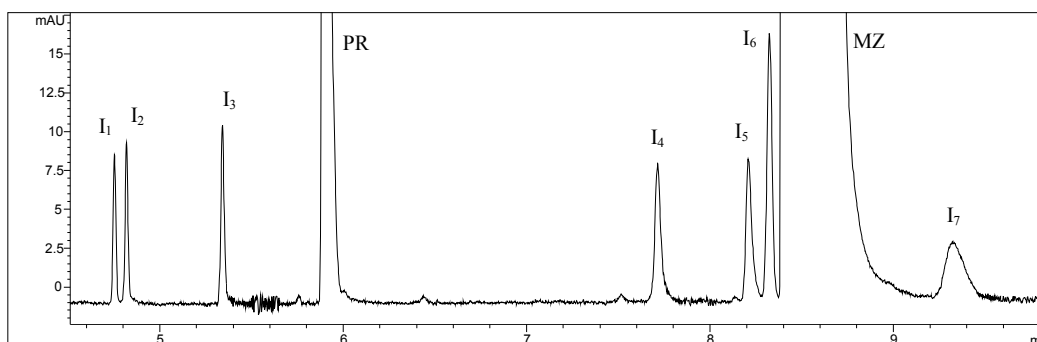


Fig. 4.20. Elettroferogramma alle condizioni ottimizzate: fosfato/TEA 105 mM pH=3, TM $\beta$ CD 10 mM, 19 °C, 30 kV.

Il metodo ottimizzato è stato quindi sottoposto a convalida seguendo le linee guida ICH [94]. Sono stati valutati i parametri selettività, robustezza, ripetibilità del tempo di migrazione e delle aree corrette, linearità e range di linearità, accuratezza e precisione, *system suitability* e, per le impurezze, i limiti LOD e LOQ. In particolare per il test di robustezza è stato applicato il disegno sperimentale mediante una matrice di Plackett-Burman a otto esperimenti. Si è evidenziata la necessità di inserire nella procedura un avvertimento cautelativo per il pH e la concentrazione di ciclodestrina, che devono essere accuratamente controllati. Dai risultati del test è stato anche possibile definire i limiti di *system suitability*.



Il metodo sviluppato è stato quindi applicato all'analisi di un campione reale di compresse rivestite (Mizollen<sup>®</sup>, Sanofi-Aventis) contenenti 10 mg di mizolastina bromidrato. Il contenuto in mizolastina è risultato essere in accordo con il dichiarato (recovery,  $97.2 \pm 1.6\%$ ; RSD, 1.1%;  $n=4$ ,  $\alpha=0.025$ ) e non è stata rilevata alcuna impurezza.

#### 4.5. MEKC

In MEKC (*Micellar ElectroKinetic Chromatography*), la selettività delle separazioni è ottenuta aggiungendo al BGE un tensioattivo al di sopra della sua concentrazione micellare critica (cmc). Quando viene applicato il campo elettrico gli analiti neutri sono separati in base alla loro distribuzione tra la soluzione dell'elettrolita e le micelle di tensioattivo. La fase micellare è detta pseudostazionaria, cioè non è fissa come nella cromatografia tradizionale, ma si muove con proprie velocità e direzione non correlate a quelle della fase mobile. La separazione degli analiti avviene all'interno di una finestra di migrazione definita dalla differenza tra la velocità di migrazione della soluzione di elettrolita, identica a quella del flusso elettroosmotico (*electro-osmotic flow*, EOF), e l'effettiva velocità di migrazione delle micelle [34].

In altre parole, i soluti che risiedono esclusivamente nella fase mobile (soluzione dell'elettrolita) non sono separati e vengono eluiti dalla colonna al tempo  $t_0$ , mentre quelli che risiedono esclusivamente nella fase pseudostazionaria non sono separati e vengono eluiti al tempo  $t_{mc}$ . I soluti che si distribuiscono tra le due fasi possono essere separati ed eluiscono ad un tempo di ritenzione  $t_R$  caratteristico per ogni soluto ( $t_0 < t_R < t_{mc}$ ) (fig. 4.21).

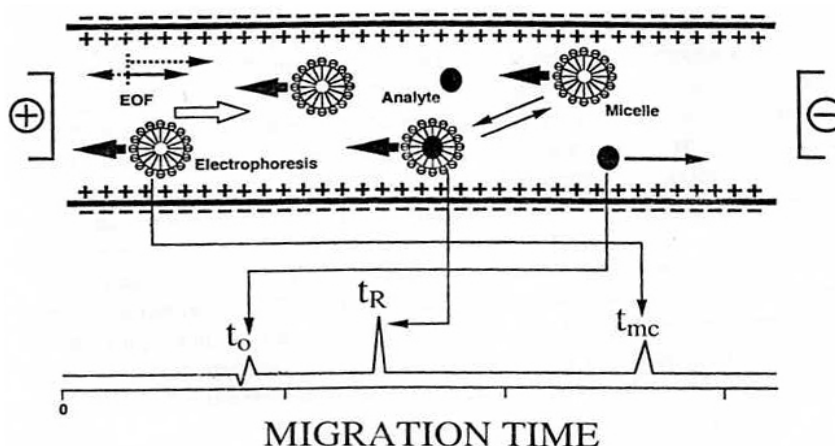


Fig. 4.21. Rappresentazione schematica di un sistema MEKC contenente un surfattante anionico.

La finestra di migrazione definisce la capacità di picco per il sistema di separazione, cioè il massimo numero di picchi che in un dato intervallo di tempo possono essere separati nell'elettroferogramma con una precisata separazione tra picchi adiacenti. Per i soluti neutri la selettività dipende essenzialmente dalla differenza delle costanti di distribuzione tra le due fasi, mentre per i soluti ionizzati oltre a questa entra in gioco anche la differenza delle mobilità elettroforetiche effettive. Le vantaggiose proprietà cinetiche danno luogo ad un'alta efficienza (>200000 piatti teorici) e ad una buona capacità di picco, anche per sistemi con una stretta finestra di migrazione [34].

La riuscita della separazione quindi dipende soprattutto dalla scelta del tensioattivo, dall'ottenimento di una accettabile finestra di migrazione e da condizioni sperimentali che portino ad un'elevata efficienza. Questi parametri sono influenzati dalle caratteristiche del capillare, dall'intensità del campo elettrico e dalla temperatura, dalla composizione del tampone acquoso (forza ionica, pH...), dal tipo e dalla concentrazione del tensioattivo, dalla scelta di eventuali additivi (solvente organico, agente complessante...) e dalla loro concentrazione [34].

La teoria generale della MEKC rappresenta la confluenza tra i principi cromatografici e quelli elettroforetici.

La mobilità elettroforetica apparente di un analita in MEKC dipende da tre fattori [34]:

1. la mobilità del flusso elettroosmotico del sistema;
2. la frazione di analita nella soluzione dell'elettrolita e la sua mobilità elettroforetica;
3. la frazione di analita nella fase pseudostazionaria e la mobilità elettroforetica delle micelle (assumendo che la mobilità del complesso analita-micella sia la stessa di quella delle micelle).

Il fattore di capacità del soluto  $k'$ , è definito come il rapporto tra le moli di analita nella fase pseudostazionaria e quelle nella fase mobile, e viene calcolato misurando i tempi di migrazione secondo l'equazione:

$$k' = \frac{(t_R - t_0)}{t_0(1 - t_R / t_{mc})}$$

dove  $t_R$ ,  $t_{mc}$  e  $t_0$  sono rispettivamente il tempo di migrazione dell'analita, il tempo di migrazione delle micelle e il tempo di migrazione di un soluto neutro che non interagisce con

la fase pseudostazionaria. La sola differenza tra il fattore di capacità in MEKC e nella cromatografia convenzionale ( $k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$ ) è il fattore  $(1 - t_R / t_{mc})$  al denominatore dell'equazione, che tiene conto del movimento della fase pseudostazionaria. Quando  $t_{mc}$  tende a infinito, si ha una vera e propria fase stazionaria e l'equazione assume la forma convenzionale [34].

### ***Micelle di tensioattivo***

I tensioattivi sono composti anfifili formati da una catena idrocarburica apolare con un gruppo di testa polare o ionico. Per convenzione vengono classificati secondo la carica del gruppo polare in anionici, cationici, non ionici e zwitterionici, o secondo il tipo di catena idrofobica in idrocarburici, sali biliari, fluorocarburici [59,60].

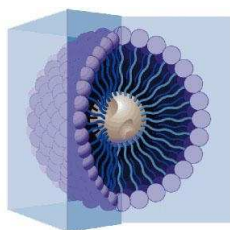


Fig. 4.22. Struttura di una micella.

La caratteristica generale comune a tutti i tensioattivo è la formazione di aggregati molecolari (micelle) quando la loro concentrazione supera un valore caratteristico detto concentrazione micellare critica (cmc). La *driving force* per la formazione delle micelle in fase acquosa è la favorevole variazione di energia libera che accompagna l'allontanamento della porzione idrocarburica del tensioattivo dall'acqua impacchettando i gruppi apolari in un nucleo centrale circondato dalle teste ioniche o polari (fig. 4.22). La repulsione elettrostatica tra le teste nelle micelle ioniche e l'ingombro sterico delle teste idrate nel caso di quelle non ioniche si oppone a questo guadagno di energia libera. La cmc, la dimensione, la forma ed il numero di aggregazione delle micelle dipendono dall'equilibrio tra i fattori che promuovono la formazione delle micelle e quelli che vi si oppongono.

La porzione interna delle micelle è fluida e relativamente non polare. È formata da gruppi di tipo idrocarburico intrecciati e variamente orientati e la viscosità del nucleo delle micelle può essere maggiore di un ordine di grandezza di quella di idrocarburi con catena di lunghezza simile. La superficie delle micelle è formata dalle teste polari o ioniche del tensioattivo con legati i contraioni e molecole di acqua. La carica netta delle micella è minore del numero di aggregazione, indicando che una gran parte dei contraioni rimane associata alla micella. I principali fattori che influenzano la cmc e la dimensione delle micelle ioniche

sono il tipo di gruppo di testa ed i contraioni associati, la dimensione e la struttura della porzione idrocarburica, la concentrazione degli elettroliti aggiunti e la temperatura [61].

Per quanto riguarda la forma delle micelle, in soluzione acquosa molti dei più comuni tensioattivi ionici a concentrazioni comprese tra 1 e 10 volte la cmc formano micelle sferiche. A più alte concentrazioni, o in presenza di elettroliti o di additivi organici, le micelle da sferiche convertono in ellissoidali, *rod-like* o comunque in altre forme nelle quali le teste polari del tensioattivo risultano essere associate più vicine tra loro. Le micelle sferiche e quelle ellissoidali hanno una bassa variabilità delle dimensioni, caratterizzata da uno stretto intervallo di numeri di aggregazione. Le micelle *rod-like* possono essere visualizzate come formate da una parte centrale cilindrica con due estremità sferiche, e sono spesso caratterizzate da una larga dispersione dei numeri di aggregazione. Poiché una micella ha un piccolo volume, deve passare a micella *rod-like* per avere un rapporto volume/superficie maggiore. L'aggiunta di elettroliti o l'aumento della concentrazione di un tensioattivo ionico aumenta la forza ionica, schermando parzialmente le forze di repulsione tra le teste polari e facendo diventare più stabili le forme non sferiche e maggiormente impacchettate, rispetto alle sferiche [34].

Alcoli a catena corta ed altri additivi, come ad esempio l'urea, aumentano la cmc dei tensioattivi attraverso la loro influenza sulla struttura del solvente [61]. Gli additivi non sono di norma incorporati dentro le micelle, a differenza degli alcoli a catena lunga, che tendono a diminuire la cmc in corrispondenza dell'aumento della loro concentrazione attraverso la loro solubilità nelle micelle e la riduzione della repulsione elettrostatica tra le teste ioniche [62]. Ad una concentrazione di additivi organici relativamente bassa (<25% v/v) l'aggregazione dei monomeri di tensioattivo in soluzione acquosa viene sostanzialmente inibita [63].

### ***Tipi di tensioattivo***

In MEKC viene usato solo un piccolo numero di tensioattivi. Questi possono essere classificati in tensioattivi anionici (contenenti come teste ioniche ioni solfato, solfonato o carbossilato), sali biliari, tensioattivi cationici (contenenti teste ioniche di ammonio quaternario), e vari tensioattivi zwitterionici e neutri usati per la formazione di micelle miste [59,60]. In generale per poter utilizzare un tensioattivo in MEKC questo dovrebbe avere una bassa cmc ed un basso punto di Kraft [34].

Le tipiche concentrazioni di tensioattivo ionico usate in MEKC vanno da 10 a 200 mM. Infatti, più alte concentrazioni portano allo sviluppo di una eccessiva corrente durante l'analisi e all'aumento della viscosità della soluzione, per cui in pratica la cmc deve essere inferiore a 200 mM. D'altra parte sono comunque preferibili cmc inferiori a 10 mM per fornire un range di concentrazione all'interno del quale poi ottimizzare i fattori di capacità.

Il punto di Kraft è la temperatura alla quale la solubilità del tensioattivo è uguale alla concentrazione critica micellare. Al di sotto del Kraft point il tensioattivo precipita dalla soluzione, quindi tensioattivi con un Kraft point superiore alla temperatura ambiente in genere non vengono utilizzati. Inoltre il tensioattivo deve essere disponibile in forma pura, avere una buona solubilità nella soluzione dell'elettrolita ed essere stabile nel range di pH necessario a mantenere un sufficiente flusso elettroosmotico (per tensioattivi anionici tale range è di solito pH=6-9). Inoltre dovrebbe avere una bassa assorbanza UV, dato che questa è la più comune tecnica di rilevazione in MEKC [34].

In tab. 4.3 vengono riportate le caratteristiche di alcuni tensioattivi comuni [34].

| <i>Tensioattivi</i>                 | <i>cmc (mM)<br/>in H<sub>2</sub>O</i> | <i>No. aggregazione</i> | <i>Punto di Kraft<br/>(°C)</i> |
|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| <i>Anionici</i>                     |                                       |                         |                                |
| Sodium dodecylsulfate (SDS)         | 8.1                                   | 62                      | 9                              |
| Sodium dodecanesulfonate            | 7.2                                   | 54                      | 37.5                           |
| Sodium N-lauroyl-N-methyltaurine    | 8.7                                   |                         | <0                             |
| Lithium perfluorooctanesulfonate    | 6.7                                   |                         |                                |
| <i>Sali biliari</i>                 |                                       |                         |                                |
| Sodium cholate                      | 13-15                                 | 2-4                     |                                |
| Sodium deoxycholate                 | 4-6                                   | 4-10                    |                                |
| Sodium taurocholate                 | 10-15                                 | 5                       |                                |
| <i>Cationici</i>                    |                                       |                         |                                |
| Tetradecyltrimethylammonium bromide | 3.5                                   | 75                      |                                |
| Hexadecyltrimethylammonium bromide  | 0.92                                  | 61                      |                                |
| <i>Zwitterionici</i>                |                                       |                         |                                |
| Sulfobetain-SB-12                   | 3.3                                   | 55                      | <0                             |
| CHAPS                               | 8                                     | 10                      |                                |
| MAPS                                | 0.1-0.4                               |                         |                                |

|                   |      |    |
|-------------------|------|----|
| <i>Non ionici</i> |      |    |
| Brij 35           | 0.09 | 40 |
| Tween 20          | 0.95 |    |

Tab. 4.3. Caratteristiche dei tensioattivi più comunemente usati in MEKC.

### ***Mixed Micellar ElectroKinetic Chromatography (MMEKC)***

Le proprietà di ritenzione delle micelle costituite da un singolo tensioattivo possono essere modificate formando micelle miste aggiungendo tensioattivi con differenti proprietà di solubilizzazione o additivi organici solubilizzati dalle micelle. Questi sistemi possono essere impiegati per la separazione di composti con strutture molto simili tra loro come serie di omologhi, aminoacidi, peptidi [64,96].

tensioattivi con carica netta pari a zero come non ionici e zwitterionici non possono essere usati da soli per la separazione di composti neutri perché la loro mobilità è identica a quella del flusso elettroosmotico. Quando però sono aggiunti ad un tensioattivo ionico, si formano micelle miste con una carica netta complessiva ed una selettività modulabile (*Mixed Micellar Electrokinetic Chromatography, MMEKC*) [64,65]. I tensioattivi non ionici e zwitterionici nelle micelle miste portano a variazioni di selettività, distribuzione e tempo di separazione senza influenzare la corrente e di solito senza diminuire l'efficienza. Inoltre le micelle miste possono portare ad un'espansione della finestra di migrazione con conseguente aumento della capacità di picco del sistema [34,65].

Le principali limitazioni all'ottimizzazione della selettività di sistemi micellari misti sono il piccolo numero di tensioattivi con proprietà di solvatazione significativamente diverse e soprattutto la polidispersione per quanto riguarda dimensioni e composizione delle micelle [34,88]. Dimensioni e composizione delle micelle variano infatti al variare della frazione molare dei due tensioattivi che compongono il sistema e dipende dalle differenze nelle strutture dei loro residui lipofili e dalle interazioni tra i loro gruppi idrofili. Questo effetto può portare alla presenza contemporanea di micelle di tensioattivi non ionici e di micelle miste di tensioattivi anionici/neutri con diverse mobilità elettroforetiche con conseguenti problemi in termini di controllo della selettività del sistema [88].

Additivi organici solubili in acqua, come metanolo ed acetonitrile, influenzano la selettività della MEKC in modo simile alla cromatografia in fase inversa. In altre parole, essi modulano le proprietà solubilizzanti dell'elettrolita acquoso avendo solo un minimo effetto

sulla fase pseudostazionaria. La loro possibilità di utilizzo è tuttavia ridotta a causa dell'instabilità delle micelle a moderate concentrazioni di solventi organici ed i tempi di analisi risultano in genere aumentati a causa della riduzione di EOF [66]. Un'altra possibilità è data da composti come alcoli ad alto peso molecolare, che possono essere solubilizzati dalle micelle formando vere e proprie micelle miste che hanno le stesse proprietà descritte nel caso dell'uso di diversi tensioattivi [62].

### ***Complessi di inclusione***

Composti macrociclici possono essere usati come additivi in MEKC per la loro importante proprietà di modificare la selettività attraverso la formazione di un complesso di inclusione con una grande varietà di composti e ioni scarsamente idrosolubili [67,68].

Ad esempio, ciclodestrine neutre in tamponi contenenti micelle di tensioattivo sono risultate utili per la separazione di composti neutri idrofobici e di peptidi con carica netta simile. I composti idrofobici si distribuiscono tra le ciclodestrine e le micelle. Quando l'analita viene incluso nella cavità della ciclodestrina, questo migra con la mobilità del flusso elettroosmotico, e quando è incorporato nelle micelle migra con la mobilità elettroforetica delle micelle. Di conseguenza, la differente distribuzione del campione tra la ciclodestrina e le micelle dà luogo ad una separazione con diversa selettività rispetto a quella del sistema con le sole micelle. Questo tipo di approccio è utile per la separazione di composti strutturalmente simili e isomeri di posizione [34].

#### ***4.5.1. Insidie e successi nell'applicazione del disegno sperimentale allo sviluppo di un metodo MMEKC per l'analisi di budesonide e delle sue impurezze [96].***

Questa applicazione riguarda lo sviluppo e l'ottimizzazione di un metodo elettroforetico capillare per la determinazione di budesonide e delle sue impurezze di sintesi nella forma farmaceutica. La budesonide (BD, miscela epimerica di forme  $\alpha$ - e  $\beta$ -propiliche di 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -butylidenedioxy-11 $\beta$ ,21-dihydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione) è un farmaco corticosteroide con attività glucocorticoide impiegata nel trattamento di patologie infiammatorie intestinali croniche come morbo di Crohn e colite ulcerosa. Secondo le informazioni del fornitore Astra Zeneca (Lund, Sweden), quattro principali impurezze ( $I_1$ ,  $I_2$ ,  $I_3$ ,  $I_4$ ) potrebbero essere presenti nella forma farmaceutica (fig. 4.23).

La budesonide e le sue impurezze sono tutte specie neutre in soluzione acquosa, prive di mobilità elettroforetica intrinseca e con soltanto piccole differenze strutturali. Per questo sono state testate diverse fasi pseudostazionarie per ottenere un'efficiente separazione dei composti, ed migliori risultati si sono ottenuti con un sistema MMEKC (Mixed Micellar Electrokinetic Chromatography).

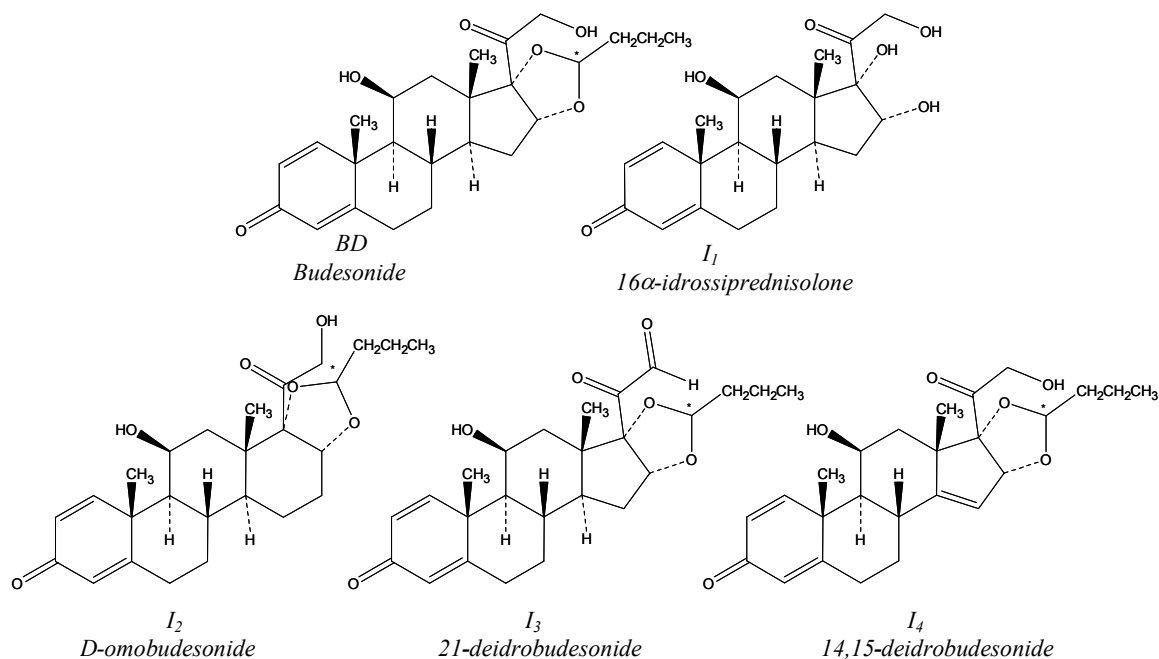


Fig. 4.23. Strutture molecolari degli analiti: budesonide e impurezze correlate.

Da analisi preliminari risultava evidente che i maggiori problemi erano la separazione di BD e I<sub>4</sub>, che differivano soltanto per un doppio legame, e la rivelazione di I<sub>3</sub>, che mostra un'assorbanza inferiore agli altri composti. Quindi in base alla separazione di BD e I<sub>4</sub> e alla rivelazione del picco di I<sub>3</sub>, la miglior fase pseudostazionaria è risultata essere un sistema micellare misto costituito dal tensioattivo anionico sodio colato e dallo zwitterionico MAPS in un tampone borato. Impiegando questo sistema, non solo venivano separate le quattro impurezze, ma anche i due epimeri della budesonide BD<sub>1</sub> e BD<sub>2</sub>, ed il problema era la separazione di I<sub>4</sub>, il cui picco cadeva esattamente tra i picchi dei due isomeri BD<sub>1</sub> e BD<sub>2</sub>.

Diversi fattori influenzavano significativamente l'analisi, rendendo necessaria l'applicazione di una strategia multivariata. Come già visto in precedenza, nello sviluppo di metodi di elettroforesi capillare uno studio della superficie di risposta può essere considerato il miglior approccio al problema, visto il limitato numero di variabili che è possibile considerare e la rapidità dell'analisi. Tuttavia questo approccio può presentare alcuni problemi. Ad esempio durante l'ottimizzazione del metodo, si possono verificare inversioni



nell'ordine di migrazione degli analiti che rendono impossibile la misurazione univoca delle risposte di risoluzione tra i picchi e quindi il loro trattamento statistico. Inoltre è fondamentale l'esecuzione di esperimenti preliminari che permettano di individuare il dominio sperimentale da investigare.

In questo studio il dominio sperimentale per i fattori considerati è stato:  $X_1$ , voltaggio, 15-25 kV;  $X_2$ , concentrazione del tampone, 30-70 mM;  $X_3$ , concentrazione del sodio colato, 40-80 mM;  $X_4$ , concentrazione MAPS, 5-15 mM;  $X_5$ , pH, 8.2-9.2. Al centro di questo dominio l'ordine di migrazione era:  $I_1$ ,  $I_2$ ,  $I_3$ ,  $BD_1$ ,  $I_4$ ,  $BD_2$ . I valori di risoluzione critici sono risultati essere principalmente  $R_1$  (risoluzione tra  $BD_1$  e  $I_4$ ) e  $R_2$  (risoluzione tra  $I_4$  e  $BD_2$ ). Un disegno di Doehlert è stato inizialmente scelto per stimare i coefficienti di un modello quadratico che descrivesse la relazione tra i fattori e la risposta. Considerando 5 variabili erano necessari 33 esperimenti incluse le ripetizioni al centro del dominio, poi ridotti a 27 mediante l'applicazione di un algoritmo D-ottimale. Questo primo disegno ha evidenziato alcuni problemi a livello di pianificazione degli esperimenti e trattamento dei dati (fig. 4.24).

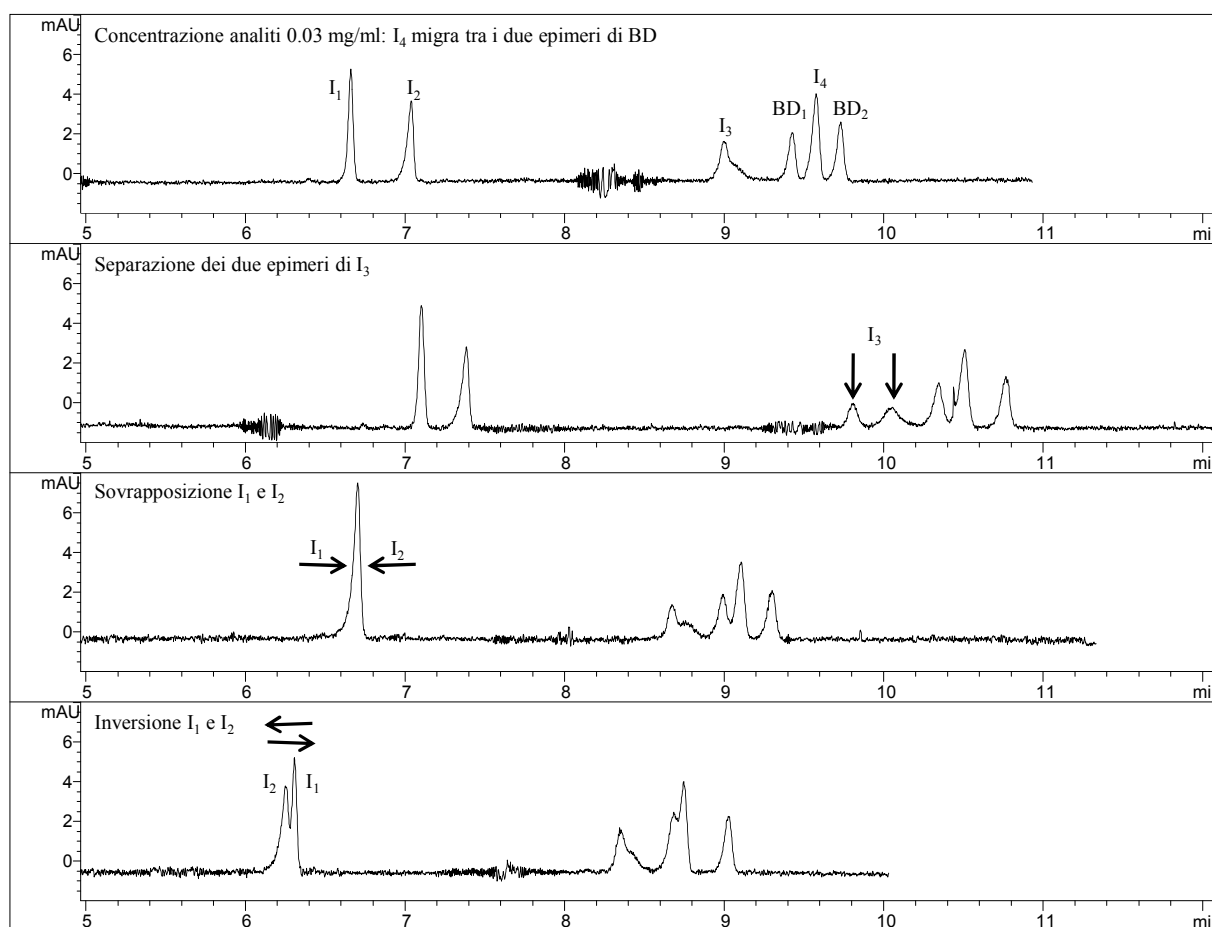


Fig. 4.24. Effetti sulla separazione dei picchi di alcune condizioni di analisi previste dal piano sperimentale.

Il primo problema ha riguardato la scelta della concentrazione test degli analiti con la quale condurre gli esperimenti del disegno. Solitamente le concentrazioni test degli analiti per lo studio della superficie di risposta corrispondono alle loro concentrazioni finali che si impiegheranno nell'analisi del campione reale. In particolare nel caso di controllo di qualità farmaceutico la separazione degli analiti dovrebbe essere assicurata fissando per le impurezze un livello di concentrazione pari al 1% p/p rispetto all'analita principale (nel nostro caso 10 mg/ml per BD e 100 µg/ml per le impurezze). In queste condizioni il picco di BD presenterebbe un'area molto maggiore degli altri, andando probabilmente a coprire picchi con tempi di migrazione simili, in particolare  $I_4$ . Allo stesso tempo per comprendere approfonditamente il sistema in studio era necessario capire l'andamento della separazione e l'ordine di migrazione degli analiti. Per questo è stato deciso di fissare tutti gli analiti ad un basso livello di concentrazione (0.03 mg/ml) con lo scopo di ottenere un elettroferogramma con tutti i picchi di dimensioni comparabili, anche se in questo modo non era possibile ottenere una previsione delle risoluzioni alle concentrazioni test degli analiti ed individuare le condizioni ottimizzate di analisi. La seconda difficoltà incontrata ha riguardato la rivelazione di  $I_3$ , che risultava ancora più impegnativa in alcune condizioni previste dal piano sperimentale che portavano alla separazione dei due epimeri dell'impurezza, con conseguente riduzione dell'altezza dei picchi. Inoltre dai risultati del disegno sperimentale era chiaro che alcune variazioni nella composizione del BGE potevano portare alla sovrapposizione o all'inversione dell'ordine di migrazione di  $I_1$  e  $I_2$ , rendendo impossibile la misurazione univoca della risposta di risoluzione tra i due picchi ed il suo trattamento statistico.

Anche se il primo disegno sperimentale non è stato utile per ottenere informazioni necessarie al diretto ottenimento delle condizioni ottimizzate di analisi, la funzione di desiderabilità è stata comunque applicata, con lo scopo di ottenere le "migliori" condizioni di analisi che potessero funzionare da punto di partenza per un secondo disegno sperimentale condotto alle concentrazioni test degli analiti. In questo nuovo studio ci si poteva dunque concentrare sull'ottimizzazione delle risposte di risoluzione  $BD_1/I_4/BD_2$ , dato che i problemi riguardanti l'ordine di migrazione  $I_1/I_2$  e la rivelabilità di  $I_3$  erano già stati superati.

I principali cambiamenti nel nuovo disegno sperimentale sono stati la diminuzione del voltaggio ( $X_1$ ,  $V$ , 13-17 kV) per ampliare la finestra di migrazione, l'aumento della concentrazione di borato ( $X_2$ , *BGE conc.*, 60-80 mM) e colato ( $X_3$ , *CHOL conc.*, 60-80 mM) e la riduzione del dominio per la concentrazione di MAPS ( $X_4$ , *MAPS conc.*, 6-12 mM) e per il

pH ( $X_5$ , pH, 8.2-8.8). A questo punto è stato applicato un nuovo disegno di Doehlert che prevedeva 34 esperimenti e le risposte considerate sono state  $R_1$  (risoluzione  $BD_1/I_4$ ) e  $R_2$  (risoluzione  $I_4/BD_2$ ).

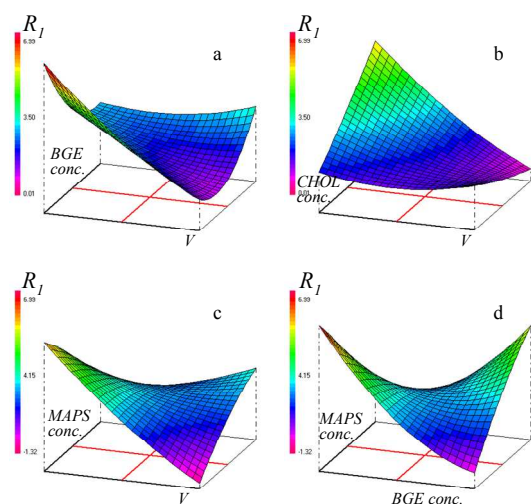


Fig. 4.25. Superfici relative alla risposta  $R_1$ .

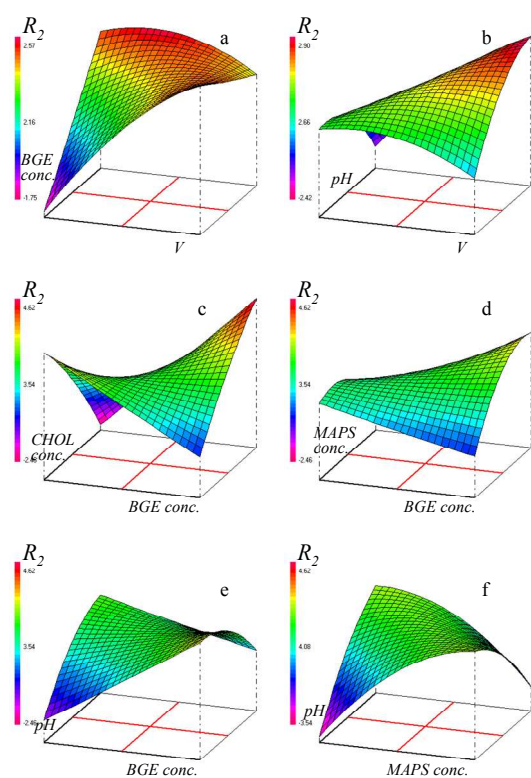


Fig. 4.26. Superfici relative alla risposta  $R_2$ .

In fig. 4.25 e 4.26 sono riportate le superfici delle risposte  $R_1$  e  $R_2$  per quei fattori che hanno mostrato le interazioni più significative, considerando ogni volta due variabili e fissando le altre tre al valore corrispondente al centro del dominio sperimentale. Con un approccio multivariato lo studio delle superfici di risposta permette di ottenere una buona descrizione del sistema elettroforetico e di individuare le interazioni tra i fattori, cosa difficile applicando una strategia univariata. Il fattore voltaggio è risultato essere critico per entrambe le risposte e la concentrazione del BGE ha mostrato forti interazioni con diversi fattori.

Le superfici relative alla risposta  $R_1$  (fig. 4.25) hanno evidenziato un'interazione positiva del voltaggio con le concentrazioni di BGE (a) e MAPS (c), mentre tra voltaggio e concentrazione di colato è stata rilevata un'interazione negativa (b). Infine si può notare come bassi o alti livelli di entrambi i fattori concentrazione di MAPS e di BGE fossero necessari per ottimizzare la risposta  $R_1$  (d).

Allo stesso modo per quanto riguarda  $R_2$  (fig. 4.26), le superfici di risposta possono essere esaminate per individuare le interazioni più significative tra i fattori e le zone del dominio sperimentale capaci di portare migliori risultati in termini di separazione. In particolare è da evidenziare un'interazione negativa tra

concentrazione di MAPS e pH (*f*), oltre ad un effetto quadratico che portava alla massimizzazione della risposta al centro del dominio sperimentale di questi due fattori.

Per ottimizzare le condizioni di analisi è stata applicata la funzione di desiderabilità  $D$ , fissando per entrambe le risposte  $R_1$  ed  $R_2$  un valore di desiderato di risoluzione pari a 1.5.

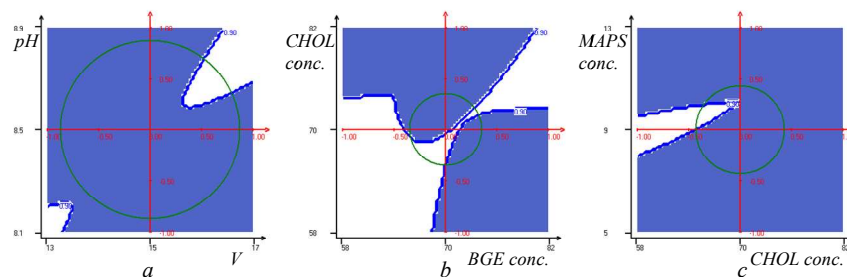


Fig. 4.27. Funzione di desiderabilità: rappresentazioni bidimensionali.

In fig. 4.27 sono riportate le rappresentazioni bidimensionali della funzione di desiderabilità per due fattori alla volta, fissando gli altri ai loro valori ottimizzati. Solo un piccolo set di valori per pH/V (*a*) e per MAPS/colato (*c*) portavano alla massima desiderabilità, mentre una vasta zona di combinazione di colato/BGE (*b*) permetteva di ottenere i valori desiderati. Grazie all'analisi dei risultati ottenuti sono state quindi individuate le condizioni ottimizzate: *voltage*, 16 kV; *borato*, 70 mM; *colato*, 65 mM; *MAPS*, 10 mM; *pH*, 8.8 (fig. 4.28).

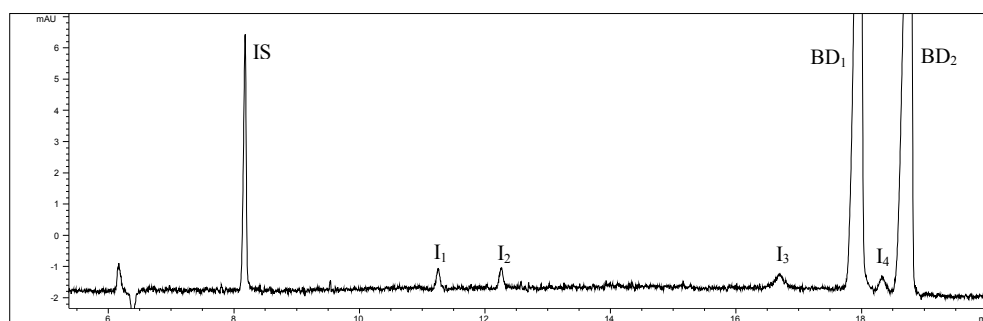


Fig. 4.28. Elettroferogramma alle condizioni ottimizzate. Budesonide, 10 mg/ml; impurezze, 100 µg/ml; standard interno, p-anisaldehyde, IS, 4 mg/ml.

Il metodo ottimizzato è stato quindi convalidato anche in questo caso seguendo le linee guida ICH [94]. La robustezza del metodo è stata valutata applicando un disegno di Plackett-Burman considerando le stesse variabili esaminate durante il processo di ottimizzazione, con l'aggiunta della temperatura, ed il loro effetto sulle risposte  $R_1$  e  $R_2$ . Non è stato individuato nessun effetto significativo per quanto riguarda  $R_1$ , mentre per  $R_2$  sono stati identificati come parametri critici la concentrazione di borace e di colato, rendendo

necessario porre un avvertimento cautelativo per quanto riguarda la fase di preparazione del BGE.

Il metodo è stato dunque applicato all'analisi di un campione reale di capsule a rilascio modificato di Entocir<sup>®</sup> contenenti 3mg di budesonide. Il contenuto è risultato essere in accordo con il dichiarato (recovery, 98.4%; RSD, 1.1%; n=4,  $\alpha=0.025$ ) e non è stata rilevata alcuna impurezza.

A causa della scarsa conoscenza del meccanismo di interazione soluti-micelle e della difficoltà di separare I<sub>4</sub> dai due epimeri di BD, il sistema è stato studiato a fondo utilizzando una strategia multivariata. La necessità di analizzare un campione complesso e il grande numero di fattori che influenzano l'analisi in elettroforesi capillare hanno costituito un difficile terreno di prova nel quale verificare le potenzialità del disegno sperimentale e di esaminare le insidie che chi lo applica si può trovare ad affrontare. Nonostante le difficoltà incontrate lo sviluppo del metodo non ha richiesto più tempo del dovuto né si è mai verificato inefficiente, dato che la pianificazione degli esperimenti ha permesso di restringere il dominio in cui condurre gli esperimenti. Infatti il disegno sperimentale è un importante strumento che permette di velocizzare la fase di ottimizzazione e di sviluppare il metodo analitico, ma porta veri vantaggi solo se il ricercatore che lo applica ha una buona conoscenza dello strumento stesso e delle condizioni in cui è opportuno impiegarlo.

#### 4.6. MEEKC

La MEEKC (*MicroEmulsion ElectroKinetic Chromatography*) è una modalità operativa della CE introdotta per la prima volta da Watarai nel 1991 [55]. Tale tecnica permette di ottenere separazioni molto efficienti di analiti sia carichi che neutri con un ampio range di idrosolubilità in alternativa alla MEKC e differisce da quest'ultima perché il BGE è una microemulsione o/w invece che una soluzione di elettrolita e tensioattivo.

Le microemulsioni sono dispersioni continue di gocce di un liquido immiscibile (olio) in un tampone acquoso [56]. Queste gocce sono rivestite da un tensioattivo che riduce la tensione interfacciale tra i due liquidi e permette il formarsi dell'emulsione [69]. La tensione è ulteriormente abbassata con l'aggiunta di un cotensioattivo, un alcool a catena breve come l'1-butanolo, che stabilizza il sistema. A causa delle piccole dimensioni delle gocce di olio disperse (inferiori a 10 nm), le microemulsioni sono trasparenti, mentre gocce di diametro superiore darebbero luogo a fenomeni di diffrazione della luce. Nonostante la tensione

interfacciale sia bassa, si può comunque verificare il problema della rottura della microemulsione; è quindi importante scegliere l'appropriata combinazione di fase acquosa, fase oleosa, tensioattivo e cotensioattivo per far sì che le microemulsioni rimangano stabili a lungo [53].

Le microemulsioni che contengono tensioattivi ionici permettono la separazione dei soluti attraverso la loro ripartizione tra le gocce oleose cariche e la fase acquosa del BGE. I composti idrofobici si distribuiscono preferibilmente nelle gocce di olio piuttosto che nella fase acquosa. I principi della ripartizione sono simili a quelli della MEKC [70], dove i soluti vengono separati in base alla loro capacità di interagire con le micelle. Tuttavia i soluti penetrano più facilmente la superficie di una goccia di olio [70] che di una micella, più rigida, e questo permette l'applicazione della MEEKC ad un campo più ampio di soluti con diverse caratteristiche. Inoltre la MEEKC fornisce condizioni di separazione più robuste ed ha una maggiore compatibilità con matrici complesse, evitando la eventuale precipitazione della matrice stessa.

Il tensioattivo più usato in MEEKC è il sodio dodecilsolfato (SDS). La goccia di olio (per

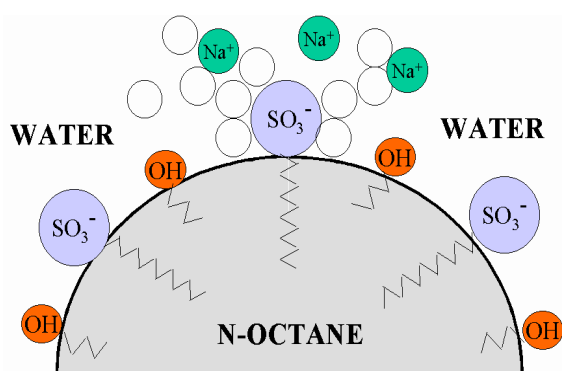


Fig. 4.29. Schema rappresentante la disposizione dei componenti di una microemulsione.

esempio *n*-ottano) è rivestita dalle molecole di SDS che le impartiscono una carica negativa. La catena alchilica formata da 12 atomi di carbonio del tensioattivo penetra nella goccia di olio mentre i gruppi idrofili solfato rimangono sulla superficie a contatto con la fase acquosa. La repulsione tra le cariche negative dei solfati evita l'eccessiva aggregazione delle gocce e

previene la formazione di una emulsione con una tensione interfacciale che non possa essere abbastanza ridotta. Inoltre un cotensioattivo, di solito un alcool a catena media come l'1-butanolo, è essenziale per la formazione della microemulsione e ne aumenta la stabilità. Il cotensioattivo collega l'olio alla fase acquosa e riduce ulteriormente la tensione interfacciale fino a zero (fig. 4.29).

La microemulsione è un'entità dinamica con un tempo di vita dell'ordine dei microsecondi [71] e le gocce al suo interno esistono in varie forme in media sferiche. Il sistema è definito ordinato se presenta bassa polidispersione [70], ossia se le gocce hanno forme simili tra loro, e gocce sferiche.

Di solito in MEEKC vengono usati tamponi acquosi con pH elevati come borato o fosfato perché quando viene applicato il voltaggio essi generano un elevato EOF diretto verso il catodo, situato nelle vicinanze del detector. Quindi, anche se le gocce di olio ricoperte di tensioattivo sono cariche negativamente e tendono a migrare verso l'anodo, l'EOF è abbastanza forte da spingere le gocce di olio verso il catodo attraverso il detector. Una tipica microemulsione per la MEEKC può essere ad esempio costituita da 0.8% *n*-ottano, 3.3% SDS, 6.6% *n*-butanolo, 89.3% tampone borato 10 mM pH 9.2 [54].

In analogia alla MEKC anche per la MEEKC è possibile valutare la finestra di migrazione e i fattori di capacità dei soluti tramite l'uso di markers di EOF e delle gocce della microemulsione. Soluti altamente idrosolubili e neutri come ad esempio il metanolo si ripartiscono prevalentemente nella fase acquosa e vengono trascinati velocemente verso il detector al tempo  $t_0$  fornendo una misura di EOF. Al contrario soluti altamente liposolubili si ripartiscono preferenzialmente all'interno delle gocce cariche. Se invece un soluto ha un fattore di capacità  $k'$  pari a 1 si ripartisce equamente tra la fase acquosa e le gocce di olio. Il tempo di migrazione o il fattore di capacità di un composto neutro possono essere direttamente correlati al suo grado di idrofilia (o lipofilia), permettendo l'uso della MEEKC nella valutazione della solubilità dei composti [72-74].

Il tempo di ritenzione  $t_R$  per una specie neutra è compreso tra  $t_0$  e  $t_{ME}$ , analogamente a quanto visto per la MEKC:

$$t_R = t_0 \left[ \frac{(1 + k')}{1 + (t_0 / t_{ME}) \cdot k'} \right]$$

dove  $t_0$  è il tempo di migrazione di soluto neutro che non interagisce con la fase pseudostazionaria e  $t_{ME}$  è il tempo necessario ad una goccia di olio per attraversare il capillare, misurabile dal tempo di migrazione di un soluto lipofilo altamente trattenuto come ad esempio il dodecilbenzene [53].

Se un soluto è ionizzato migra, appena applicato il voltaggio, in base alla sua dimensione e al numero di cariche secondo i principi dell'elettroforesi. Nel caso che sia carico negativamente, viene respinto dalla carica dello stesso segno presente sulla superficie delle gocce di olio. Al contrario, se un soluto è carico positivamente, può formare un legame ionico con le gocce che presentano una carica opposta [53].

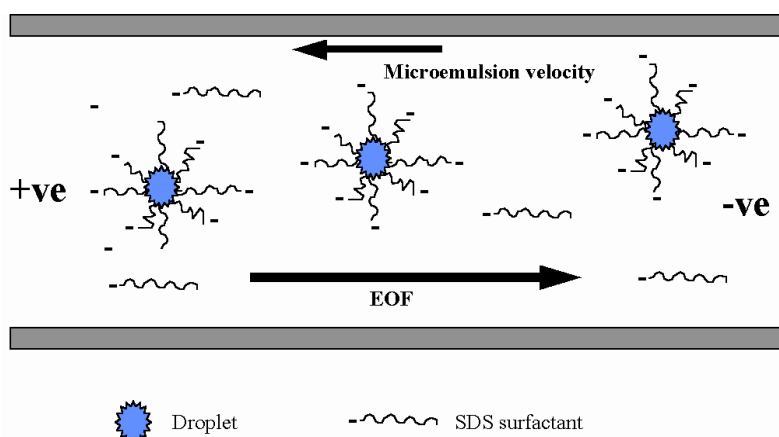


Fig. 4.30. Rappresentazione schematica di un sistema MEEKC contenente un tensioattivo anionico.

Il principio della separazione in MEEKC (fig. 4.30), è molto simile a quello proprio della MEKC, dove in tamponi acquosi basici le micelle di SDS cariche negativamente migrano contro l'EOF, causando l'aumento dei tempi di migrazione dei soluti idrofobi inclusi. Come

abbiamo visto la MEKC è una consolidata tecnica di separazione ampiamente studiata, la cui selettività può essere regolata da vari fattori tra cui le condizioni strumentali di analisi (caratteristiche del capillare, temperatura, voltaggio), composizione del tampone acquoso (forza ionica, pH...), tipo e concentrazione di tensioattivo, aggiunta di additivi (solventi organici, urea, ciclodestrine) [34,75]. Dato che una microemulsione è un sistema più complesso di una soluzione micellare, in MEEKC ci sono ancor più variabili operative, come ad esempio la concentrazione e la scelta di olio e cotensioattivo, oltre a tutte quelle presenti anche in MEKC.

La elettroforesi capillare a base di microemulsioni è una tecnica molto recente che richiede ulteriori studi, tuttavia sono già state presentate un certo numero di applicazioni che ne dimostrano la grande potenzialità in diversi campi, tra cui quello dell'analisi farmaceutica, argomento del presente studio. I suoi principali vantaggi sono la alta efficienza di separazione e la alta versatilità di utilizzo per un vasto range di soluti neutri o carichi, sia idrosolubili che liposolubili [53,54].

La complessità della composizione delle microemulsioni e del processo di separazione MEEKC permette di effettuare una fine modulazione delle condizioni operative per ottenere risoluzioni particolarmente difficili. Di seguito vengono presi in considerazione i più importanti fattori coinvolti nello sviluppo di un'analisi MEEKC.

### ***Tipo e concentrazione di tensioattivo***

Per il controllo della selettività in MEEKC i tensioattivi sono molto più importanti rispetto al core lipofilo della goccia. La scelta del tensioattivo ha un effetto marcato



nell'ottenimento di una buona separazione in quanto influenza la carica e la dimensione delle gocce di olio, l'entità e la direzione dell'EOF ed il livello di accoppiamento ionico con i soluti carichi. In generale un aumento nella lunghezza della catena del tensioattivo stabilizza la microemulsione riducendo la polidispersione [53].

Nella maggior parte dei casi l'SDS è il tensioattivo di prima scelta: dà infatti la più ampia finestra di separazione, data la densità di carica rispetto alla dimensione (tensioattivi con gruppo polare esteso portano a una riduzione della finestra) [53]. Se l'SDS viene in parte o del tutto sostituito con altri tensioattivi zwitterionici, neutri, cationici o anionici (3-(N,N-dimetilmiristilammonio)-propansulfonato, poliossietilene sorbitan monolaurato, poliossietilene lauril etere, N-cetil-N,N,N-trimetilammonio bromuro, diottilsolfosuccinato) si possono osservare variazioni di selettività [54]. Per generare microemulsioni con gocce di olio cariche negativamente sono stati utilizzati anche sali biliari anionici come sodio colato [76].

Sono stati usati anche tensioattivi cationici come il CTAB (cetiltrimetilammonio bromuro). In questo caso le gocce d'olio sono cariche positivamente e la formazione di un doppio strato di tensioattivo sulle pareti del capillare inverte il flusso elettroosmotico. Di conseguenza viene applicata una polarità inversa [77]. Usando il CTAB vengono eliminate le interazioni ioniche che i soluti cationici instaurerebbero con microemulsioni a base di SDS [108].

Anche tensioattivi neutri come Triton-X possono essere usati per ottenere le microemulsioni [78], ma da soli non sono utili per separare composti neutri, che in questo caso avrebbero la stessa velocità di migrazione delle gocce di olio e dell'EOF.

Per quanto riguarda la concentrazione del tensioattivo, un suo aumento causa l'allungamento del tempo di migrazione di soluti neutri a causa della diminuzione di EOF (per la maggiore forza ionica) e della maggiore densità di carica sulle gocce d'olio [79]. A causa di quest'ultima aumenta anche il fattore di capacità dei soluti neutri [53,79]. Se si usa una miscela di tensioattivi carichi e neutri (ad esempio SDS/Tween 21, SDS/Brij 35) l'alterazione della concentrazione dei tensioattivi può avere un effetto sull'ordine di migrazione [53].

Alte concentrazioni di tensioattivi generano microemulsioni più stabili, riducendo la tensione superficiale. Tipicamente si usano concentrazioni di SDS nell'intorno di 110 mM (3%, w/w), e in casi particolari si è arrivati al 6.5%. A concentrazione 1.6% è stata riportata instabilità [70] e all'1.4% scarsa ripetibilità [108]. A concentrazioni di SDS uguali o inferiori al 2% è stata inoltre osservata disintegrazione delle microemulsioni dopo poche ore [80].

### ***Effetto del pH***

Il pH del tampone ha un effetto marcato sulla selettività della separazione ed influenza sia il grado di ionizzazione del soluto che l'intensità dell'EOF. Solitamente in MEEKC vengono scelti tamponi con un range di pH 7-9 che generano un flusso elettroosmotico di velocità abbastanza elevata. A questi valori di pH i composti ionizzabili sono di norma dissociati. Infatti in genere i farmaci basici rimangono protonati fino a valori di pH pari a 12-13, mentre i farmaci acidi ( $pK_a$  3-6) sono ionizzati nel range usato in MEEKC [53].

I composti ionizzabili hanno un diverso comportamento rispetto a quello dei composti neutri. Analiti basici carichi positivamente sono influenzati sia dalla ripartizione o/w che dall'accoppiamento ionico con le gocce di olio cariche negativamente e hanno una mobilità elettroforetica favorevole alla riduzione dei loro tempi di migrazione. Viceversa, analiti acidi risentono molto più della repulsione delle cariche dello stesso segno sulla superficie delle gocce che della ripartizione tra le fasi [54] e hanno una mobilità elettroforetica negativa [53].

Per annullare la ionizzazione dei soluti è possibile usare valori estremi di pH. Per esempio per prevenire la dissociazione di composti acidi è stato utilizzato un tampone a pH 1.2 [55,74]. A questo pH l'EOF viene eliminato e quindi per attirare le gocce verso il detector viene utilizzata una polarità inversa. I composti normalmente più ritenuti sono eluiti per primi al contrario di quanto avviene a valori normali di pH. Per annullare la ionizzazione di composti basici sono stati invece usati tamponi a pH 12 [74]. Questi valori estremi di pH sono stati usati in MEEKC per misurare la solubilità di composti ionizzabili sulla base dei tempi di migrazione, dato che per misurare accuratamente la solubilità di un composto questo deve essere nella forma indissociata [53].

Normalmente vengono usati tamponi fortemente basici per incrementare la velocità dell'EOF. Questo tuttavia non avviene se si usano tensioattivi cationici che vengono adsorbiti dalla parete del capillare formando un doppio strato carico positivamente. Infatti ad alti valori di pH gli ioni idrossido si adsorbono sulla parete carica positivamente e rallentano il flusso [53].

### ***Fase oleosa***

Tra i solventi organici più usati per formare le gocce di olio vi sono ottano [58,81] ed eptano [82,83]. Gli alcani con catena formata da un numero dispari di atomi di carbonio come

l'eptano sono meno tossici [71], ma l'ottano dà microemulsioni maggiormente ripetibili [57]. Sostituendo *n*-ottano con toluene, 1-cloropentano, diisopropil etere, 2-ottanone, butil acetato, *n*-ottanolo si ottengono piccoli cambiamenti nella selettività [54]. Altri solventi organici utilizzati in MEEKC sono butil cloruro, etil acetato, 1-ottanolo, 1-esanolo [53,57,84-86].

In generale comunque le interazioni dell'analita con la fase organica lipofila giocano un ruolo limitato ai fini della selettività (forse questo è anche dovuto al fatto che la concentrazione di SDS è relativamente più alta di quella del solvente organico lipofilo). Inoltre, cambiando la concentrazione della fase organica nel range 0.5-2% si ottengono piccole modifiche nella migrazione, infatti tipo e concentrazione di solvente influenzano il tempo di migrazione, ma hanno un ruolo secondario rispetto a tipo e concentrazione di tensioattivo e cotensioattivo [54].

#### ***Tipo e concentrazione di cotensioattivo***

Il cotensioattivo è il parametro primario da considerare per una rapida ottimizzazione dato che è il fattore più importante per controllare e cambiare la selettività. Il cotensioattivo più usato è l'1-butanolo. Si osservano variazioni significative di selettività sostituendolo con metanolo, etanolo, 1-propanolo, acetonitrile, 2-etossietanolo, tetraidrofurano. Altri cotensioattivi utilizzati sono *tert*-butanolo, 1-pentanolo, 2-pentanolo, 3-pentanolo, ciclopentanolo, 1-esanolo, 2-esanolo [53,54].

Aumentando la concentrazione del cotensioattivo si ha un aumento delle dimensioni delle gocce [87], una più bassa densità di carica, e di solito una riduzione dei tempi di migrazione per i composti neutri [53]; i fattori di capacità non sono alterati [79]. Variando la concentrazione di cotensioattivo viene influenzata anche la viscosità e quindi l'EOF. È stato osservato che modificando la concentrazione di 1-butanolo la selettività rimane inalterata [79]. Tuttavia cambiando ampiamente la concentrazione di cotensioattivi in certi casi si è avuto un effetto sull'ordine di migrazione degli analiti [83].

#### ***Additivi organici***

In MEKC soluti altamente idrofobici si ripartiscono quasi esclusivamente nelle micelle e sono fortemente ritenuti con una scarsa risoluzione tra di loro. In questi casi si aggiungono spesso additivi organici come acetonitrile, metanolo o isopropanolo per ridurre la ritenzione ed aumentare la risoluzione. Questo tipo di approccio è stato usato anche in MEEKC. La

quantità di additivo da aggiungere in MEKC è solitamente limitata ad un massimo del 30% v/v, dato che a livelli più alti le micelle vengono distrutte. Anche per la MEEKC ci sono dei limiti massimi che nel caso vengano superati causano la rottura della microemulsione con formazione di un sistema opalescente a due fasi [53].

#### ***Aggiunta di ciclodestrine (CD-MEEKC)***

In analogia con quanto accade in MEKC, l'aggiunta alla microemulsione di ciclodestrine con diverse capacità complessanti (*cyclodextrin-modified-MEEKC*, *CD-MEEKC*) migliora la selettività della separazione ed aiuta la solubilizzazione di composti lipofili, grazie alla possibile interazione tra l'analita e la cavità altamente idrofoba della ciclodestrina [91,92]. Le ciclodestrine in queste condizioni possono costituire un sistema unico con la microemulsione o, come nel caso di ciclodestrine neutre, essere completamente distribuite nella fase acquosa del BGE. In questo secondo caso le ciclodestrine formano una seconda fase pseudostazionaria che interagisce in competizione con quella costituita dalle gocce di olio, permettendo di trattenere selettivamente gli analiti nella fase acquosa in base alla loro possibile complessazione-inclusione nella cavità della ciclodestrina [93].

#### ***Effetto della temperatura***

In MEEKC la temperatura deve essere tenuta costantemente sotto controllo in quanto influenza la solubilità del soluto, che è correlata al coefficiente di ripartizione. La mobilità elettroforetica di una specie ionizzata è inoltre influenzata dalla temperatura nell'ordine del 2% per °C [53].

La selettività di una miscela test di analiti neutri non viene influenzata dalla temperatura. Tuttavia, quando la soluzione da analizzare comprende soluti carichi e neutri si osservano variazioni di selettività dato che la temperatura ha effetti diversi su specie cariche e neutre [53].

#### ***4.6.1. Disegno di miscele nell'ottimizzazione di un metodo CD-MEEKC per la determinazione di oxibutinina e delle sue impurezze.***

L'oxibutinina (OXY, 4-(diethylamino)but-2-ynyl (RS)-2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylacetate hydrochloride) è un farmaco ad azione antimuscarinica impiegato nel trattamento dell'incontinenza urinaria.

In accordo con le informazioni fornite dal produttore Sanofi-Aventis® (Frankfurt am Main, Germany) cinque possibili impurezze ( $I_A$ ,  $I_B$ ,  $I_C$ ,  $I_D$ ,  $I_X$ ) di OXY potrebbero essere presenti nella forma farmaceutica (fig. 4.31).

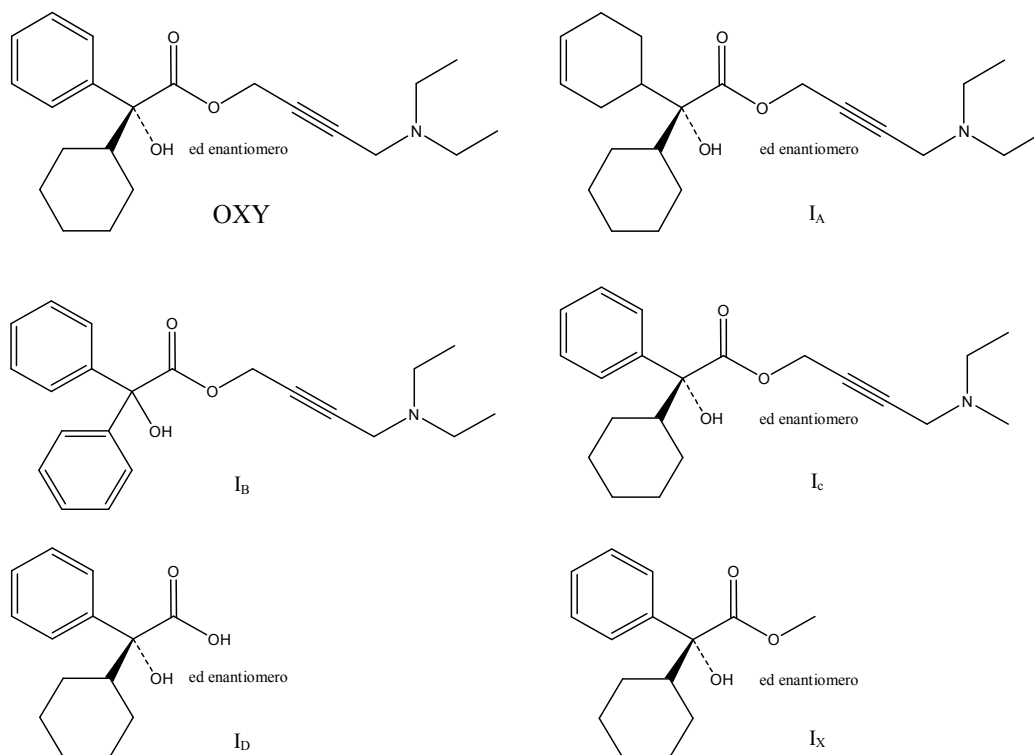


Fig. 4.31. Strutture molecolari degli analiti: oxibutinina ed impurezze correlate.

Questo studio prevedeva dunque la separazione di composti chirali, tre basici ( $OXY$ ,  $I_A$ ,  $I_C$ ), uno acido ( $I_D$ ) ed uno neutro ( $I_X$ ), e di un composto achirale basico ( $I_B$ ). A causa delle diverse proprietà acido-base degli analiti considerati, è stato deciso l'impiego di una fase pseudostazionaria. Per prima cosa è stato tentato un approccio separativo in modalità MEKC, impiegando diversi tensioattivi (Tween 20, MAPS, BRIJ, SDS), che non ha portato buoni risultati. Quindi si è provato con un sistema MEEKC ottimizzato dal nostro gruppo di ricerca in un lavoro precedente [30].

La microemulsione selezionata era composta da: borato 10 mM (90%), n-eptano (2%), SDS/butanolo 1/2 (8%), ed ha portato a risultati incoraggianti, mostrando chiaramente la separazione di tutti i composti (fig. 4.32.).

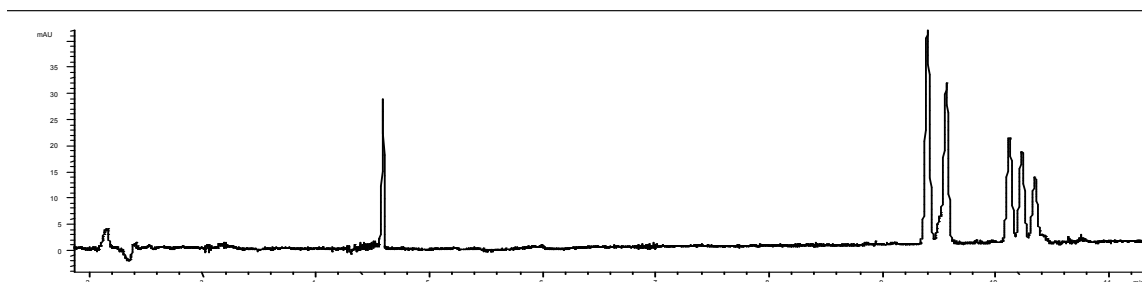


Fig. 4.32. OXY, IB, IC, ID, IX, 0.04 mg/ml ed IA 0.1 mg/ml, microemulsione ottimizzata in [30], 20°C 30kV,  $\lambda=195\text{nm}$ .

Tuttavia, nonostante la buona efficienza di separazione, i picchi in queste condizioni restavano comunque troppo vicini per ottenere una buona risoluzione alle concentrazioni test degli analiti.

Per aumentare la selettività, diverse ciclodestrine ( $\beta$ -CD, trimetil- $\beta$ -CD, idrossi-propil- $\beta$ -CD ed idrossi-propil- $\gamma$ -CD) sono state aggiunte alla microemulsione. I migliori risultati si sono ottenuti con idrossi-propil- $\beta$ -CD, che mostrava una buona risoluzione tra i picchi degli analiti e l'enantiorisoluzione di ID in una regione della finestra di migrazione vicina all'EOF, opposta a quella caratteristica di quei soluti che interagiscono maggiormente con le gocce della microemulsione (fig. 4.33).

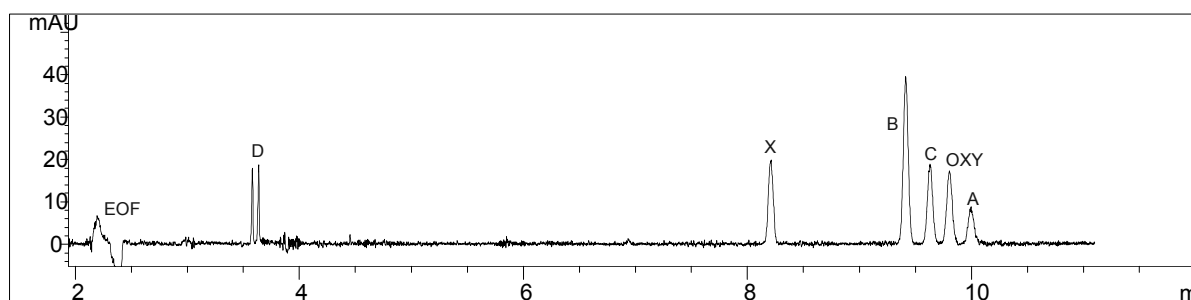


Fig. 4.33. Effetto dell'aggiunta di idrossi-propil- $\beta$ -CD 10 mM alla microemulsione.

Questo comportamento ha confermato la formazione di una seconda fase pseudostazionaria chirale nella fase acquosa della microemulsione capace di migliorare la selettività del sistema [93].

A questo punto sono state fissate le concentrazioni test per i composti in esame (OXY 8 mg/ml; impurezze 0.08 mg/ml) e per lo standard interno (acido flufenamico, FLU, 0.5 mg/ml), da utilizzare per ottimizzare la composizione della microemulsione e poi i fattori indipendenti voltaggio e concentrazione di ciclodestrina.

Per studiare la composizione della microemulsione è stato dunque applicato un disegno di miscele, scegliendo come restrizioni alla regione sperimentale i limiti fissati già in precedenza dal nostro gruppo di ricerca nell'ottimizzazione di un altro metodo MEEKC [30].

Il dominio sperimentale era compreso nel campo di esistenza della microemulsione, ed il range per le variabili selezionate è riportato in tab.4.4.

|       | Componente <sup>[a]</sup>                        | Limite inferiore | Limite superiore |
|-------|--|------------------|------------------|
| W     | Fase acquosa, borato 10mM                        | 0.880            | 0.939            |
| O     | Fase oleosa, n-eptano                            | 0.001            | 0.020            |
| S/CoS | Tensioattivo/cotensioattivo, SDS/1-butanolo, 1/2 | 0.060            | 0.100            |

<sup>[a]</sup>La somma dei componenti (v/v) è pari a 1.

Tab. 4.4. Dominio sperimentale per i fattori in studio nel disegno di miscele.

A causa della presenza di tali limitazioni, la regione sperimentale è stata ridotta ed i componenti trasformati in pseudocomponenti [95].

Per ottimizzare la composizione della microemulsione, è stato quindi ipotizzato un modello cubico speciale di Scheffé che descrivesse la relazione tra risposta e componenti:

$$Y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 + \varepsilon$$

Per stimare i coefficienti del modello è stato impiegato un disegno di miscele che prevedeva 16 esperimenti comprese 3 ripetizioni al centro del dominio. Sono state considerate come risposte le risoluzioni critiche  $R_5$  ( $I_B/I_C$ ),  $R_6$  ( $I_C/OXY$ ),  $R_7$  ( $OXY/I_A$ ) ed il tempo di analisi  $t$ , misurato come tempo di migrazione dell'ultimo picco (tab. 4.5).

| <i>N° Esp.</i> | <i>W</i> | <i>O</i> | <i>S/CoS</i> | $R_5$ | $R_6$ | $R_7$ | <i>t</i> |
|----------------|----------|----------|--------------|-------|-------|-------|----------|
| 1              | 0.9390   | 0.0010   | 0.0600       | 0.001 | 0.253 | 0.001 | 8.367    |
| 2              | 0.9200   | 0.0200   | 0.0600       | 0.001 | 0.126 | 0.001 | 8.803    |
| 3              | 0.8990   | 0.0010   | 0.1000       | 1.570 | 1.448 | 1.583 | 17.132   |
| 4              | 0.8800   | 0.0200   | 0.1000       | 1.310 | 1.522 | 2.119 | 16.028   |
| 5              | 0.9295   | 0.0105   | 0.0600       | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 9.073    |
| 6              | 0.9190   | 0.0010   | 0.0800       | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 11.446   |
| 7              | 0.9000   | 0.0200   | 0.0800       | 0.702 | 1.104 | 1.916 | 12.076   |
| 8              | 0.8895   | 0.0105   | 0.1000       | 2.530 | 1.953 | 2.746 | 15.795   |
| 9              | 0.9095   | 0.0105   | 0.0800       | 1.603 | 1.564 | 2.479 | 12.755   |
| 10             | 0.9243   | 0.0058   | 0.0700       | 0.943 | 0.982 | 2.079 | 11.376   |
| 11             | 0.9147   | 0.0153   | 0.0700       | 0.756 | 0.895 | 1.965 | 11.386   |
| 12             | 0.9043   | 0.0058   | 0.0900       | 2.012 | 1.712 | 2.652 | 13.641   |
| 13             | 0.8948   | 0.0153   | 0.0900       | 1.897 | 1.667 | 2.590 | 13.743   |
| 14             | 0.9095   | 0.0105   | 0.0800       | 1.042 | 1.332 | 2.039 | 12.692   |
| 15             | 0.9095   | 0.0105   | 0.0800       | 0.588 | 0.901 | 1.874 | 12.049   |
| 16             | 0.9095   | 0.0105   | 0.0800       | 1.299 | 1.217 | 2.147 | 12.779   |

Tab. 4.5. Piano sperimentale del disegno di miscele e risposte misurate.

Per queste risposte sono stati dunque calcolati i coefficienti del modello ipotizzato e dall'analisi della varianza (ANOVA) il modello è risultato essere valido e significativo.

In questo modo è stato possibile disegnare le superfici di risposta e studiare la relazione tra risposta e percentuale dei componenti. Nel disegno di miscele la presenza delle limitazioni ai livelli dei componenti rende particolarmente utile l'impiego di *contour plots*, rappresentazioni riportanti linee di isorisposta che permettono facilmente di individuare l'ottimale proporzione tra le componenti. In questo caso, in una rappresentazione bidimensionale, la risposta è proiettata sul piano corrispondente ai fattori, per mezzo di curve di isorisposta (fig. 4.34).

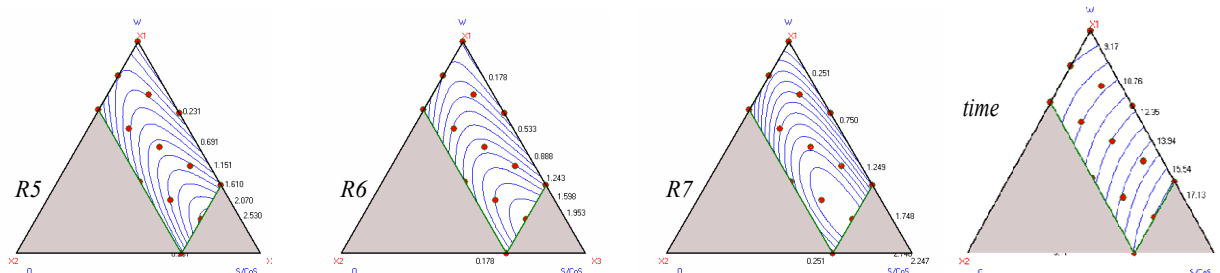


Fig. 4.34. Contour plots per le risposte  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  e  $t$ . I punti in rosso corrispondono alle condizioni previste dal piano sperimentale.

Per quanto riguarda la risposta  $R_5$ , si può osservare che è possibile massimizzarla muovendosi verso alti livelli di S/CoS e bassi livelli di tampone acquoso, mentre per quanto riguarda la fase oleosa, utilizzando alti livelli di S/CoS, valori di risoluzione maggiori di 1.5 sono garantiti in tutto il dominio. In particolare per mantenere buoni valori di risoluzione, è richiesta un'alta frazione di olio se la percentuale di S/CoS diminuisce e viceversa. Questo probabilmente è dovuto ad una diminuzione del flusso elettroosmotico, che aumenta la risoluzione tra gli analiti. Lo stesso andamento può essere osservato per le risoluzioni  $R_6$  ed  $R_7$ , con l'unica differenza che per alte percentuali di S/CoS la risoluzione è mantenuta su buoni valori in una zona più ampia del dominio sperimentale. Il tempo di analisi diminuisce impiegando alte frazioni di tampone acquoso e basse percentuali di S/CoS, mentre la componente oleosa non sembra influenzare significativamente questa risposta.

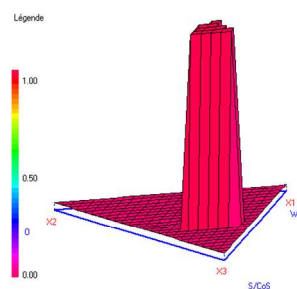


Fig. 4.35. Funzione di desiderabilità totale.

Per ottimizzare simultaneamente le risposte è stata applicata nuovamente la funzione di *desiderabilità*  $D$  di Derringer [6] selezionando come valori desiderati le risoluzioni critiche  $R_5$ ,  $R_6$  ed  $R_7$  maggiori di 1.5 ed un tempo di analisi inferiore a 14 minuti. La rappresentazione tridimensionale della funzione di desiderabilità totale (fig. 4.35) mostra una vasta zona del dominio sperimentale dove la desiderabilità è pari a zero. Questo effetto è dovuto alla



complessità del sistema separativo che rende difficoltoso individuare il miglior compromesso tra le risposte considerate.

I requisiti desiderati sono stati soddisfatti da una microemulsione così composta: *W*, borato 10 mM, 89.1%; *O*, *n*-eptano, 1.7%; *S/CoS*, SDS/1-butanolo, 9.2%. Questo sistema ha mostrato buone caratteristiche tecnologiche in termini di stabilità ed ha portato ad una buona separazione degli analiti (fig. 4.36).

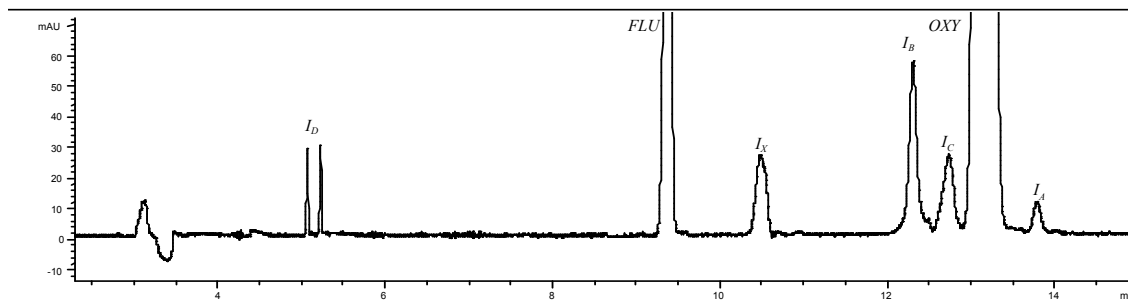


Fig. 4.36. Microemulsione ottimizzata, idrossi-propil- $\beta$ -CD 16 mM, 20°C, 27 kV,  $\lambda=195\text{nm}$ ; iniezione idrodinamica 50 mbar, 5 sec.

A questo punto, con l'obiettivo di diminuire il tempo di analisi e migliorare l'efficienza mantenendo sempre una buona separazione degli analiti, sono stati ottimizzati i fattori indipendenti voltaggio e concentrazione di ciclodestrina, fissando la temperatura al valore standard ambiente di 20°C. Per studiare questi due fattori è stata applicata la metodologia della superficie di risposta ed un disegno di Doehlert che prevedeva 6 esperimenti più 4 ripetizioni al centro del dominio è stato impiegato per stimare i coefficienti del modello. Il range investigato è stato 12-20 mM per la concentrazione di idrossi-propil- $\beta$ -CD e di 24-30 kV per il voltaggio. Le risposte considerate sono state nuovamente  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  ed il tempo di analisi  $t$  (tab. 4.6).

| <i>N° Esp.</i> | <i>Conc.CD</i><br>mM | <i>Voltaggio</i><br>kV | $R_5$ | $R_6$ | $R_7$ | $t$<br>min |
|----------------|----------------------|------------------------|-------|-------|-------|------------|
| 1              | 20                   | 27                     | 1.166 | 1.803 | 2.677 | 12.60      |
| 2              | 12                   | 27                     | 2.834 | 1.472 | 1.997 | 13.74      |
| 3              | 18                   | 30                     | 2.237 | 1.755 | 1.661 | 10.11      |
| 4              | 14                   | 24                     | 2.656 | 1.869 | 2.709 | 17.45      |
| 5              | 18                   | 24                     | 1.680 | 2.268 | 3.579 | 16.86      |
| 6              | 14                   | 30                     | 2.859 | 1.621 | 1.893 | 10.36      |
| 7              | 16                   | 27                     | 2.019 | 1.616 | 2.174 | 12.47      |
| 8              | 16                   | 27                     | 1.614 | 2.244 | 2.553 | 13.13      |
| 9              | 16                   | 27                     | 2.187 | 1.920 | 2.778 | 12.98      |
| 10             | 16                   | 27                     | 2.044 | 1.810 | 2.684 | 13.26      |

Tab. 4.6. Piano sperimentale e risposte misurate.

Il modello è risultato essere valido e significativo per tutte le risposte in studio.

In fig. 4.37 sono riportate le superfici di risposta come funzioni di voltaggio e concentrazione di ciclodestrina.

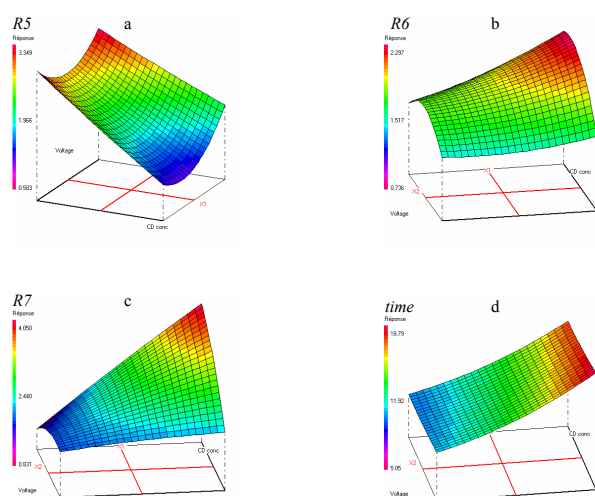


Fig. 4.37. Superfici di risposta voltaggio/concentrazione di ciclodestrina.

I migliori risultati per la risposta  $R_5$  (a) si sono ottenuti ad alti livelli di voltaggio ed in particolare a basse concentrazioni di ciclodestrina, mostrando un'interazione negativa fra i due fattori. Nel caso di  $R_6$  (b) ed  $R_7$  (c), un basso voltaggio ed elevate concentrazioni di ciclodestrina erano necessarie per massimizzare le risposte, mentre i migliori risultati per il tempo di analisi si sono ottenuti ad alti voltaggi, con un effetto

neutro della concentrazione di ciclodestrina.

Le singole superfici di risposta possono essere esaminate per ottenere una buona descrizione del sistema, ma per trovare le condizioni ottimizzate generali è stato necessario applicare nuovamente la funzione di desiderabilità d. I valori desiderati sono stati valori di risoluzione maggiori di 1.5 ed un tempo di analisi inferiore ai 12 minuti.

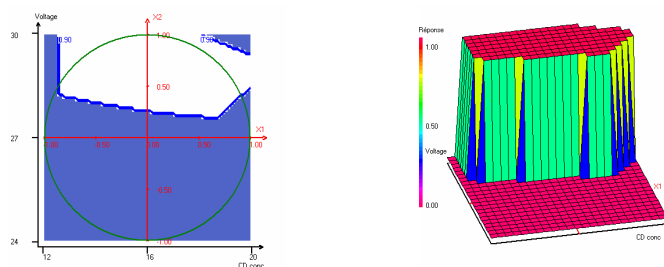


Fig. 4.38. Funzione di desiderabilità: rappresentazioni bi- e tridimensionali.

Le rappresentazioni della funzione di desiderabilità (fig. 4.38) mostrano chiaramente che il fattore critico è il voltaggio e che ne sono richiesti alti valori. Infatti, con un voltaggio pari a 29 kV, praticamente tutti i valori di concentrazione di

ciclodestrina hanno fornito buoni risultati. Le condizioni ottimizzate selezionate *voltaggio, 29 kV; concentrazione di idrossi-propil- $\beta$ -CD, 18 mM*, hanno permesso di ottenere una completa separazione degli analiti è stata ottenuta in meno di 12 minuti (fig. 4.39).

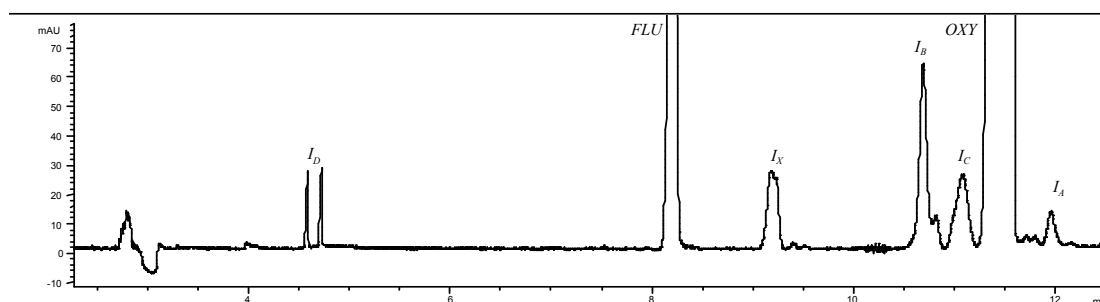


Fig. 4.39. Condizioni ottimizzate: 29 kV, idrossi-propil- $\beta$ -CD 18 mM, 20 °C,  $\lambda=195$  nm.

I valori di risoluzione tra i picchi erano tutti superiori a 1.5, ed il numero di piatti teorici per capillare (48.5 cm) andava da 15000 a 300000, dimostrando l'elevata efficienza del sistema proposto.

Il metodo è stato dunque convalidato seguendo le linee guida ICH [94], ed applicato all'analisi di un campione reale di compresse di Ditropan<sup>®</sup> contenente 5 mg di oxibutinina cloridrato, il contenuto è risultato essere in accordo con il dichiarato (recovery  $96.9 \pm 0.6\%$ ,  $n=4$ ,  $\alpha/2=0.025$ ; RSD 0.4%).

## 5. CONCLUSIONI

Il lavoro svolto durante il Dottorato di Ricerca ha permesso di investigare a fondo le potenzialità dell'elettroforesi capillare in analisi farmaceutica, attraverso lo studio e lo sviluppo di metodi che coinvolgevano diverse sue modalità operative quali CZE, MMEKC, CD-MEEKC.

L'elettroforesi capillare ha confermato di essere uno strumento analitico flessibile nell'utilizzo, dal momento che consente la modulazione di diverse condizioni operative al fine di ottenere la separazione desiderata e tempi di analisi brevi. Nello stesso tempo richiedendo principalmente l'impiego di soluzioni acquose, presenta basso impatto ambientale.

La convalida dei metodi secondo la normativa ICH ha dimostrato la loro adeguatezza per scopi farmaceutici. In particolare l'utilizzo dell'elettroforesi zonale consente di ottenere metodi caratterizzati da un errore totale sotto il 5%, mentre maggiori problemi sono stati incontrati nell'uso delle microemulsioni. In questo caso infatti la complessità del sistema di separazione diminuisce la ripetibilità del metodo con aumento dell'errore totale. Tali sistemi devono quindi essere utilizzati nel caso di separazioni molto complesse previa esclusione di modalità operative più semplici.

Infine l'utilizzo sistematico del disegno sperimentale ha confermato le sue potenzialità soprattutto in presenza di sistemi complessi, non solo per l'ottenimento delle condizioni ottimizzate finali, ma anche per la ricerca iniziale del corretto dominio sperimentale da esplorare.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] J.L. Goupy, *Methods for Experimental Design*, Elsevier, Amsterdam, 1992.
- [2] J.A. Cornell, *Experiments and mixtures. Designs, models and the analysis of mixture data*, J. Wiley & Sons, 2<sup>nd</sup> Ed., New York, USA, 1990.
- [3] R.G. Brereton, *Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant*, J. Wiley & Sons, Chichester, UK, 2003.
- [4] I.E. Frank, R. Todeschini (Eds.), *The Data Analysis Handbook*, Elsevier, Amsterdam, 1994.
- [5] A. Peissik, *Methodologie de la recherche experimentale: proprietes et caracteristiques des matrices d'experiences pour les modeles polynomiaux du second degre*, Tesi di Dottorato in Scienze, Marseille, 1995.
- [6] G.A. Lewis, D. Mathieu, R. Phan-Tan-Luu, *Pharmaceutical Experimental Design*, Marcel Dekker, New York, 1999.
- [7] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, *Chemometrics: a Textbook*, Elsevier, Amsterdam, 1988.
- [8] G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter, *Statistics for Experimenters*, Wiley Interscience, 2005.
- [9] S.L. Costa Ferreira, R.E. Bruns, E.G. Paranhos da Silva, W.N. Lopes dos Santos, C.M. Quintella, J.M. David, J. Bittencourt de Andrade, M.C. Breitkreitz, I.C. Sales Fontes Jardim, B.B. Neto, *J. Chromatogr. A*, 1158, (2007) 2-14.
- [10] S.L. Costa Ferreira, W.N. Lopes dos Santos, C.M. Quintella, B.B. Neto, J.M. Bosque-Sandra, *Talanta*, 63, (2004) 1061-1067.
- [11] Y. Vander Heyden, D.L. Massart in M.M.W.B. Hendriks, J.H. de Boer, A.K. Smilde, *Robustness of Analytical Chemical Methods and Pharmaceutical Technological Products*, Elsevier, Amsterdam, 1996.
- [12] R. Carlson, *Design and Optimization in Organic Synthesis*, Elsevier, Amsterdam, 1992.
- [13] S.N. Deming, S.L. Morgan, *Experimental Design: a Chemometric Approach*, Elsevier, Amsterdam, 1993.

- [14] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, Å. Nyström, J. Pettersen, R. Bergman, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 42 (1998) 3-40.
- [15] B. Campisi, D. Chicco, D. Vojnovic, R. Phan-Tan-Luu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1998) 57-65.
- [16] B. Campisi, D. Vojnovic, D. Chicco, R. Phan-Tan-Luu, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 48 (1999) 59-70.
- [17] A. Kamoun, M. Chaabouni, M. Sergent, R. Phan-Tan-Luu, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 63 (2002) 69-79.
- [18] S. Cafaggi, R. Leardi, B. Parodi, G. Caviglioli, G. Bignardi, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 65 (2003) 139-147.
- [19] L. Eriksson, E. Johansson, C. Wikstrom, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 43 (1998) 1-24.
- [20] K.D. Altria, M.A. Kelly, B.J. Clark, *Trends Anal. Chem.* 17 (1998) 204-213.
- [21] K.D. Altria, M.A. Kelly, B.J. Clark, *Trends Anal. Chem.* 17 (1998) 214-226.
- [22] K.D. Altria, A. Marsh, C. Sängers-van de Griend, *Electrophoresis* 27 (2006) 2263-2282.
- [23] U. Holzgrabe, D. Brinz, S. Kopeck, C. Weber, Y. Bitar, *Electrophoresis* 27 (2006) 2283-2292.
- [24] S. Orlandini, S. Fanali, S. Furlanetto, A. M. Marras, S. Pinzauti, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 253-263.
- [25] E. Castellanos Gil, P. Dehouck, A. Van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, *Electrophoresis* 22 (2001) 497-502.
- [26] E. Kaale, A. Van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 451-458.
- [27] H. Brunkvist, B. Karlberg, Å. Astervik, I. Granelli, *J. Chromatogr. B* 807 (2004) 293-300.
- [28] F. Suss, V. Harang, C.E. Sanger-van de Griend, G.K.E. Scriba, *Electrophoresis* 25 (2004) 766-777.
- [29] S. Mallampati, S. Leonard, S. De Vulder, J. Hoogmartens, A. Van Schepdael, *Electrophoresis* 26 (2005) 4079-4088.
- [30] S. Furlanetto, S. Orlandini, A.M. Marras, P. Mura, S. Pinzauti, *Electrophoresis* 27 (2006) 805-818.

- [31] M. Fillet, I. Bechet, P. Hubert, J. Crommen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 1107-1114.
- [32] S.F.Y. Li, *Capillary Electrophoresis*, Elsevier, Amsterdam, 1992.
- [33] C. Schwer, E. Kenndler, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1801-1807.
- [34] C. F. Poole, *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 2003.
- [35] D.N. Geiger, *High Performance Capillary Electrophoresis-An Introduction*, Hewlett-Packard, Waldbronn, 1992.
- [36] Tagliaro, F., Smith, F. P., *TRAC-Trend. Anal. Chem.* 1996, 15, 513-525.
- [37] D.C. Harris, *Chimica Analitica Quantitativa*, 2<sup>a</sup> ed., Zanichelli, Bologna, 2005.
- [38] Y. Xu, *Chem. Educ.* 1 (1996) 1-14.
- [39] F. Tagliaro, G. Manetto, F. Crivellante, F.P. Smith, *Forensic Sci. Int.* 92 (1998) 75-88.
- [40] K.D. Altria, *J. Chromatogr. A* 1023 (2004) 1-14.
- [41] Z. Juvancz, J. Szejtli, *TRAC-Trend. Anal. Chem.* 21 (2002) 379-388.
- [42] M. Blanco, I. Valverde, *TRAC-Trend. Anal. Chem.* 22 (2003) 428-439.
- [43] P.T.T. Ha, J. Hoogmartens, A. Van Schepdael, *J. Chromatogr. A* 41 (2006) 1-11.
- [44] J.H.T. Luong, A.L. Nguyen, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 431-444.
- [45] S.A.C. Wren, R.C. Rowe, *J. Chromatogr.* 603 (1992) 235-241.
- [46] S. Nie, R. Dadoo, R.N. Zare, *Anal. Chem.* 65 (1993) 3571-3575.
- [47] S. Terabe, Y. Miyashita, Y. Ishihama, O. Shibata, *J. Chromatogr.* 636 (1993) 47-55.
- [48] M.J. Sepaniak, C.L. Copper, K.W. Whitaker, V.C. Anigbogu, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2037-2041.
- [49] O.H.J. Szolar, R.S. Brown, J.H.T. Luong, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3004-3010.
- [50] B. Chankvetadze, W. Lindner, G.K.E. Scriba, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4256-4260.
- [51] C.J. Easton, S.F. Lincoln, *Chem. Soc. Rev.* 25 (1996) 163-170.
- [52] M. Fillet, I. Bechet, P. Chiap, P. Hubert, J. Crommen, *J. Chromatogr. A* 717 (1995) 203-209.
- [53] K.D. Altria, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 171-186.
- [54] S.H. Hansen, C. Gabel-Jensen, D.T.M. El-Sherbiny, S. Pedersen-Bjergaard, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 614-619.
- [55] H. Watarai, *Chem. Lett.* 3 (1991) 391-394.
- [56] P. Kumar, K.L. Mittal, *Handbook of Microemulsion Science and Technology*, Marcel Dekker, New York, 1999.

- [57] X. Fu, J. Lu, A. Zhu, *J. Chromatogr. A* 735 (1996) 353-356.
- [58] K.D. Altria, *J. Chromatogr. A* 844 (1999) 371-386.
- [59] M.G. Khaledi, *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 3-40.
- [60] P.J. Muijselaar, K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 41-61.
- [61] C.F. Poole, S.K. Poole, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 89-104.
- [62] S. Katsuta, K. Saitoh, *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 165-178.
- [63] R.M. Seifar, J.C. Kraak, W.T. Kok, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2772-2778.
- [64] J.G. Bumgarner, M.G. Khaledi, *J. Chromatogr. A* 738 (1996) 275-283.
- [65] E.S. Ahuja, B.P. Preston, J.P. Foley, *J. Chromatogr. B* 657 (1994) 271-284.
- [66] K. Sarmini, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 3-11.
- [67] S. Terabe, Y. Miyashita, O. Shibata, E.R. Barnhardt, L.R. Alexander, D.G. Patterson, B.L. Karger, K. Hosoya, N. Tanaka, *J. Chromatogr.* 516 (1990) 23-31.
- [68] I.S. Lurie, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 297-307.
- [69] F. Sicoli, D. Langevin, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 14819-14823.
- [70] S. Terabe, N. Matsubara, Y. Ishihama, Y. Okada, *J. Chromatogr.* 608 (1992) 23-29.
- [71] A. Berthod, M. De Carvalho, *Anal. Chem.* 64 (1992) 2267-2272.
- [72] Y. Ishihama, Y. Oda, K. Uchikawa, N. Asakawa, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1588-1595.
- [73] M.H. Abraham, C. Treiner, M. Roses, C. Rafols, Y. Ishihama, *J. Chromatogr. A* 752 (1996) 243-249.
- [74] S.J. Gluck, M.H. Benko, R.K. Hallberg, K.P. Steele, *J. Chromatogr. A* 744 (1996) 141-146.
- [75] J. Vindevogel, P. Sandra, *Introduction to Micellar Electrokinetic Chromatography*, Hüthig, Heidelberg, 1992.
- [76] I. Miksik, Z. Deyl, *J. Chromatogr. A* 807 (1998) 111-119.
- [77] R.L. Boso, M.S. Bellini, I. Miksik, Z. Deyl, *J. Chromatogr. A* 709 (1995) 11-19.
- [78] H. Watarai, I. Takahashi, *Anal. Commun.* 35 (1998) 289-292.
- [79] L. Song, Q. Ou, W. Yu, G. Li, *J. Chromatogr. A* 699 (1995) 371-382.
- [80] M.F. Miola, M.J. Snowden, K.D. Altria, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1998) 785-797.
- [81] H. Watarai, *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 93-102.

- [82] H. Watarai, K. Ogawa, M. Abe, T. Monta, I. Takahashi, *Anal. Sci.* 7 (1991) 245-248.
- [83] R. Szücs, E. Van Hove, P. Sandra, *J. High Resolut. Chromatogr.* 19 (1996) 189-192.
- [84] G. Li, Z. Chen, M. Liu, Z. Hu, *Analyst* 123 (1998) 1501-1505.
- [85] I. Miksik, J. Gabriel, Z. Deyl, *J. Chromatogr. A* 772 (1997) 297-303.
- [86] L. Vomastova, I. Miksik, Z. Deyl, *J. Chromatogr. B* 681 (1996) 107- 113.
- [87] N. Gorski, M. Gradzielski, H. Hoffmann, Ber. Bunsenges. *Phys. Chem.* 100 (1996) 1109-1117.
- [88] H. Zhang, P.L. Dubin, *J. Colloid Interf. Sci.* 186 (1997) 264.
- [89] S. Orlandini, I. Giannini, S. Pinzauti, S. Furlanetto, *Talanta*, 74 (2008) 570-577.
- [90] S. Orlandini, I. Giannini, R. Gotti, S. Pinzauti, E. La Porta, S. Furlanetto, *Electrophoresis*, 28 (2007) 395-405.
- [91] H. Okamoto, T. Nakajima, Y. Ito, T. Aketo, K. Shimada, S. Yamato, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 517-528.
- [92] L.C. Chang, H.T. Chang, S.W. Sun, *J. Chromatogr. A* 1110 (2006) 227-234.
- [93] R. Pomponio, R. Gotti, J. Fiori, V. Cavrini, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 24-30.
- [94] ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Q2(R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (2005).
- [95] J.A. Cornell, Experiments and mixtures. *Designs, models and the analysis of mixture data*, J. Wiley & Sons, 2<sup>nd</sup> Ed., New York, USA, 1990.
- [96] S. Furlanetto, S. Orlandini, I. Giannini, G. Beretta, S. Pinzauti, *Electrophoresis*, in press.



## 7. APPENDICE

### ESTRATTI DEI LAVORI PUBBLICATI

- S. Orlandini, I. Giannini, R. Gotti, S. Pinzauti, E. La Porta, S. Furlanetto: *Development of a CZE method for the determination of mizolastine and its impurities in pharmaceutical preparations using Response Surface Methodology*, **Electrophoresis**, 28 (2007) 395-405.
- S. Furlanetto, S. Lanteri, S. Orlandini, R. Gotti, I. Giannini, S. Pinzauti: *Selection of background electrolyte for CZE analysis by a chemometric approach Part I. Separation of a mixture of acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs*, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 43 (2007) 1388-1401.
- S. Furlanetto, S. Lanteri, S. Orlandini, R. Gotti, I. Giannini, S. Pinzauti: *Selection of background electrolyte for CZE analysis by a chemometric approach Part II. Separation of a mixture of basic beta-blocker drugs*, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 43 (2007) 1402-1408.
- S. Orlandini, I. Giannini, S. Pinzauti, S. Furlanetto: *Multivariate optimisation and validation of a capillary electrophoresis method for the analysis of resveratrol in a nutraceutical*, **Talanta**, 74 (2008) 570-577.
- G. Pieraccini, S. Furlanetto, S. Orlandini, G. Bartolucci, I. Giannini, S. Pinzauti, G. Moneti: *Identification and determination of mainstream and sidestream smoke components in different brands of cigarettes by means of solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry*, **J. Chromatogr. A**, 1180 (2008) 138-150.
- S. Furlanetto, S. Orlandini, I. Giannini, G. Beretta, S. Pinzauti: *Pitfalls and success of experimental design in the development of a Mixed Micellar ElectroKinetic Chromatography method for the analysis of budesonide and its impurities*, **Electrophoresis**, in press.